



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato di Ricerca in Oncologia - XXX ciclo

ADENOCARCINOMA POLMONARE:  
INTERAZIONE TRA MICROAMBIENTE E CELLULE STAMINALI  
MESENCHIMALI

Relatore:

Prof. Mohsen Ibrahim

Correlatori:

Prof.ssa Antonella Calogero

Prof.ssa Elena De Falco

Dottoranda:

Dott.ssa Camilla Poggi

## INDICE

1. Background.....	pag.4
2. Adenocarcinoma polmonare.....	pag.6
3. Cellule staminali.....	pag.6
4. Cellule staminali mesenchimali.....	pag. 8
5. Ruolo delle cellule staminali mesenchimali nel microambiente tumorale.....	pag.10
6. Cellule mesenchimali provenienti da tessuto adiposo mediastinico.....	pag.12
7. Esosomi.....	pag.14
a. Biogenesi degli esosomi.....	pag.14
b. Componenti molecolari esosomali.....	pag.15
c. Proteine esosomali.....	pag.15
d. Acidi nucleici esosomali.....	pag.16
e. Funzione di esosomi nella carcinogenesi polmonare.....	pag.17
f. Esosomi e transizione epitelio mesenchimale (EMT).....	pag.17
g. Esosomi e trasformazione delle cellule oncogeniche.....	pag.18
h. Esosomi e angiogenesi.....	pag.18
i. Esosomi, nicchie premetastatiche e metastasi.....	pag.19
j. Esosomi e la modulazione della risposta immunitaria nel microambiente tumorale .....	pag.19
k. Esosomi come biomarcatori nel cancro polmonare.....	pag.20
l. Proteine esosomali.....	pag.20
m. miRNA esosomali.....	pag.21
8. Scopo del lavoro.....	pag.22
9. Materiali e Metodi.....	pag.22
a. Raccolta campioni chirurgici e database clinico.....	pag.23
b. Isolamento e coltura cellule staminali mesenchimali.....	pag.23

c. Crescita cellulare e vitalità delle cellule staminali mesenchimali.....	pag.24
d. Linee cellulari.....	pag.25
e. Condizionamento in vitro delle colture cellulari con supernatanti provenienti dalla colture di cellule staminali mesenchimali .....	pag.25
i. Saggi proliferazione- MTS assay.....	pag.25
ii. Saggio di migrazione.....	pag.27
iii. Saggio di formazione di cloni.....	pag.27
iv. Analisi del profilo delle citochine.....	pag.29
f. Metodi analisi esosomi.....	pag.29
9. Risultati.....	pag.42
10. Discussione.....	pag.46
11. Iconografia.....	pag.52
12. Bibliografia.....	pag.61

## 1. BACKGROUND

Il tumore del polmone è il più frequente cancro per incidenza e mortalità. Sebbene la prevenzione ed un precoce intervento possono migliorare la prognosi dei pazienti, la biologia del tumore polmonare rimane ancora non del tutto conosciuta. Negli ultimi anni l'attenzione è stata spostata sul ruolo del microambiente tumorale e delle nicchie tumorali all'interno dei tessuti. All'interno del microambiente tumorale la componente stromale esercita un ruolo regolatorio fondamentale; tra i vari elementi presenti le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono considerate di particolare rilevanza.

Le MSCs sono cellule multipotenti che manifestano svariate importanti proprietà che vanno dalla capacità di differenziarsi in molti tipi cellulari, alla immunomodulazione, fino a proprietà di trofismo tumorale<sup>1</sup>. Infatti negli ultimi anni le MSCs sono state considerate i candidati ideali per numerose applicazioni cliniche e terapeutiche, includendo una loro possibile applicazione anche nel trattamento della patologia neoplastica.<sup>2</sup>

L'interazione tra MSCs ed il tumore è complessa e ampiamente dibattuta. Non è chiaro se le MSCs abbiano una azione favorente lo sviluppo e la progressione del tumore polmonare o se ne arrestino la tumorigenesi. Infatti l'azione delle MSCs nel microambiente tumorale favorisce l'evoluzione del tumore stesso mediante meccanismi di neo-angiogenesi<sup>3</sup>. Le capacità di trans-differenziazione di queste cellule nei fibroblasti associati al tumore del polmone sembra favorisca sia il processo di metastatizzazione<sup>4</sup> sia il fenomeno di farmaco-resistenza<sup>5-6</sup>. Inoltre è stato riconosciuto che il reclutamento endogeno di MSCs (di diversa origine, comprese quelle di derivazione adiposa) da nicchie tumorali remote si verifichi in seguito al rilascio di fattori infiammatori solubili tumorali e che esista una correlazione tra le cellule mesenchimali tumorali circolanti e lo stadiamento patologico della neoplasia<sup>7</sup>. D'altra parte le proprietà immunomodulatorie della MSCs, che specificamente ospitano il tumore in numerose patologie neoplastiche tra cui il polmone, (attraverso l'espressione di citochine tra cui SDF-1, TNF-alfa,

molte interleuchine e o attraverso l'attivazione di specifici recettori ) possono essere sfruttate dalle MSCs stesse come veicoli per geni anticancerogeni<sup>8</sup> e anche per migliorare il danno causato da chemio e radioterapia sul tumore stesso<sup>1</sup>. Di conseguenza a causa del ruolo sfaccettato delle MSCs e del loro doppio comportamento biologico, il loro utilizzo clinico nella patologia neoplastica è tuttora dibattuto. Questo scenario è ancora complicato da potenziali alterazioni fenotipiche e funzionali delle MSCs causate dal tumore. Infatti le MSCs derivate dal tessuto adiposo e dal midollo osseo hanno presentato differenze nel contenuto cellulare e nello stato epigenetico<sup>9</sup>. Oltretutto, MSCs derivanti da differenti tessuti come cuore, derma, midollo osseo e tessuto adiposo, è stato dimostrato presentino differenze genotipiche che esprimono diversi livelli di markers di cellule staminali embrionali come OCT-4 NANOG e SOX-2<sup>10</sup>. Quando le MSCs sono derivate del tessuto tumorale mostrano alterazione molecolari e funzionali, suggerendo che caratteristiche tumorali come benignità o malignità possano essere influenzate dall'ambiente da cui provengono le MSCs.<sup>11-12</sup>

Inoltre, diversi metodi di isolamento e coltura di MSCs, nonché le caratteristiche fenotipiche, funzionali e molecolari ancora scarsamente studiate, hanno contribuito a confondere i risultati, impedendo così ulteriori progressi nella conoscenza di queste cellule. Ad oggi non è ancora chiaro se l'origine tissutale delle MSCs possa svolgere un ruolo chiave nella comunicazione tra neoplasia e MSCs. Infatti le popolazioni di MSCs all'interno dello stroma tumorale sono influenzate dal tumore stesso, ma possono anche essere mobilitate da nicchie locali e remote. Inoltre, le caratteristiche del tumore come la sua benignità o malignità potrebbero influenzare potenzialmente ambienti cancerogeni. Possiamo quindi ipotizzare che i microambienti sviluppati dalle MSCs, in presenza di tumore, possano anche essere modificati in funzione sia del tipo di MSCs che dalla istologia del tumore.<sup>13</sup>. In particolare quello ancora da determinare è il ruolo del micro e macro ambiente come prodotto finale dell'interazione tra il tumore del polmone e le cellule staminali mesenchimali. Una profonda conoscenza delle dinamiche biologiche e molecolari tra il cancro e le MSCs in nicchie remote potrebbe rivelarsi essenziale nel fornire una

nuova visione sulla patogenesi e progressione del cancro del polmone e nel determinare nuove strategie diagnostiche e terapeutiche.

## 2. ADENOCARCINOMA POLMONARE

Nel mondo il carcinoma broncogeno è la prima causa di morte per tumore ed è in continuo aumento con il più alto numero di nuove diagnosi annue (attualmente si contano più di 1,2 milioni di nuovi casi all'anno). Per frequenza è preceduto solo dal tumore della prostata negli uomini e dal tumore della mammella nelle donne. L'adenocarcinoma polmonare presenta una mortalità globale estremamente elevata, con una sopravvivenza a 5 anni del 15%. In particolare, negli Stati Uniti questi tumori rappresentano la principale causa di morte per entrambi i sessi, costituendo il 28,7% di tutte le diagnosi di neoplasia maligna. Tale percentuale supera i tassi di mortalità combinata del carcinoma della prostata, del carcinoma colon-rettale e del carcinoma della mammella. Negli ultimi 20 anni l'aumento dell'abitudine al fumo di sigaretta nelle donne ha portato l'incidenza della malattia nei due sessi dal rapporto di 5 : 1 all'attuale 2,5 : 1. Il carcinoma broncogeno ha un picco di incidenza tra i 40 ed i 70 anni, prevalentemente nella sesta e settima decade. La frequenza del tumore sotto i 40 anni, che si aggirava intorno al 2%, è in aumento dato l'abbassamento dell'età nell'uso del tabacco da fumo<sup>14</sup>.

Il fumo di sigaretta è il primo agente coinvolto nella genesi del carcinoma polmonare. Le statistiche mettono in evidenza che l'87% dei tumori polmonari interessa fumatori attivi o che hanno da poco interrotto l'abitudine tabagica. L'inizio precoce dell'abitudine al fumo, la durata e la quantità di fumo inalato, l'uso o meno del filtro, sono direttamente proporzionali all'insorgenza del tumore polmonare.<sup>15</sup>

Numerosi casi di distribuzione familiare di carcinoma broncogeno evidenziano la sua componente genetica interagente con i fattori ambientali. Si sta tentando di definire i marcatori di suscettibilità genetica, vi è un ruolo del polimorfismo del gene del citocromo P450 CYP1A1. I portatori di questo gene presentano una aumentata capacità di metabolizzare gli agenti

cancerogeni derivati dall'azione del fumo aumentando quindi anche il rischio di tumore. Sono coinvolti anche il gene GSTM1 che codifica per l'enzima glutanione S-trasferasi e polimorfismi in geni preposti alla riparazione del DNA. La rottura dell'equilibrio tra geni oncogeni e geni oncosoppressori produce lo sviluppo del tumore. L'azione di tutti gli agenti eziopatogenetici riportati può provocare alterazioni genetiche (almeno 10 – 20) che si accumulano progressivamente conducendo al fenotipo neoplastico. Responsabili del tumore polmonare sono le famiglie degli oncogeni K-ras, erb-B, c-myc, EGFR. HER-2/neu. Gli oncosoppressori più comunemente inattivati sono il p53 (sia nei tumori polmonari non a piccole cellule NSCLC che nei tumori polmonari a piccole cellule SCLC), RB (SCLC), p16ink (NSCLC) e numerosi loci del cromosoma 3p. Sono responsabili anche numerose citochine: oltre all'aril-idrocarburo-idrossilasi, la 4-debrisochinaidrossilasi, le monossigenasi P450-dipendenti.<sup>16</sup>

### 3. CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali sono caratterizzate dalla clonogenicità, la capacità di una cellula di generare una colonia clonale geneticamente identica alla cellula di partenza; dall'autorinnovamento, la capacità di una cellula di dare origine a due cellule figlie di pari potenza della madre e dalla divisione asimmetrica. Le cellule staminali adulte (o staminali somatiche) possiedono un potenziale differenziativo ridotto rispetto alle embrionali e sono state primariamente individuate nei tessuti ad alto turn-over cellulare, come la cute, l'epitelio gastroenterico ed il tessuto emopoietico.

Le cellule staminali possono derivare da cellule staminali germinali, da cellule staminali embrionali e da cellule staminali adulte. Tutte queste cellule rispettano le caratteristiche di staminalità, ma presentano molte differenze riguardo alle loro specifiche potenzialità.

In base alla loro capacità di differenziarsi in tipi cellulari specializzati, le cellule staminali si possono classificare in totipotenti, quelle che si ritrovano dalla fecondazione fino allo stadio di morula; esse sono in grado di dare origine a tutte le cellule dei tessuti embrionali ed extraembrionali. Le cellule staminali pluripotenti sono in grado di differenziarsi in uno qualsiasi dei tre foglietti germinativi del tessuto embrionale (endoderma, mesoderma, ectoderma) e derivano dalle cellule della massa interna. Le cellule staminali multipotenti sono in grado di differenziarsi in tutti linee cellulari di un singolo foglietto germinativo. Le cellule staminali Bi-/Uni-potenti sono in grado di dare origine a due o ad una tipologia cellulare<sup>17</sup>.

Le cellule staminali presentano una capacità di autorinnovarsi che può essere definita come virtualmente infinita a causa del fisiologico processo di accorciamento dei telomeri, grazie ai possibili riarrangiamenti genici e all'insorgenza di mutazioni aberranti che riducono in realtà la loro vitalità e la loro capacità di autorinnovarsi. Nell'adulto, le cellule staminali somatiche sono state riscontrate in numerosi tessuti e sembrano essere dislocate in particolari localizzazioni chiamate nicchie staminali<sup>18</sup>.

#### 4. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono un sottoinsieme di cellule non-ematopoietiche multipotenti che si ritrovano principalmente nel midollo osseo, ma possono essere isolate anche in altre fonti, quali il cordone ombelicale ed il tessuto adiposo<sup>19</sup>.

Friedenstein et al nel 1976 hanno isolato per la prima volta delle MSCs a partire da colture di midollo osseo murino, identificando cellule fusiformi con un citoplasma denso e grandi nuclei, che nel tempo evolvevano in cellule poligonali di maggiore dimensione e mostravano proprietà funzionali e caratteristiche degli osteoblasti.<sup>20</sup> Questo dimostrava che, oltre alle cellule staminali ematopoietiche, esistevano delle cellule non-ematopoietiche nel midollo osseo capaci di formare



colonie (CFU-F) e di avere potenzialità osteogeniche. Nel 1991 Caspan et al hanno introdotto il termine cellule staminali mesenchimali per definire le cellule del mesoderma (terzo foglietto embrionale) dal quale originano le ossa, le cartilagini, i tendini, i legamenti, il tessuto adiposo, la pelle, i muscoli e lo stroma midollare.<sup>21</sup> Attualmente le colture primarie di MSCs sono definite popolazioni (progenitrici) eterogenee di cellule staminali adulte non-ematopoietiche potenzialmente in grado di amplificarsi per diversi passaggi in vitro tramite aderenza ad un substrato plastico, dotate di capacità di self-renewal a lungo termine e di differenziamento verso multipli lineage cellulari<sup>22-23-24</sup> La facilità delle metodiche di isolamento, di coltura ed il loro elevato potenziale di espansione ex-vivo hanno permesso alle MSCs di essere considerate candidate ideali da utilizzare in campo clinico nell'ambito della terapia cellulare e genica applicata alla medicina rigenerativa.

Le MSCs rappresentano una piccolissima percentuale (<0,1%) della frazione cellulare totale che compone le cellule del midollo, ma possono essere isolate ed ampliate con grande efficienza<sup>25</sup>. Le MSCs sono caratterizzate dall'espressione di un pannello di antigeni di membrana cellulare, tra cui CD105, CD73 e CD90 presenti in oltre il 95% della popolazione cellulare staminale mesenchimale e dall'assenza dell'espressione di CD14, CD34, CD19, HLA-DR e CD45<sup>26</sup>. Le MSCs possiedono la capacità di auto-rinnovarsi e possono differenziarsi in numerosi tipi cellulari tra cui gli osteoblasti, i condrociti e gli adipociti<sup>27</sup>. L'espressione di questi antigeni di superficie risulta mantenuta anche durante l'espansione in vitro. Anche se isolate da tessuti di origine diversa questi marcatori sono uniformemente espressi dalle MSCs<sup>28-29-30</sup>.

Recentemente le MSCs sono state isolate da molti tessuti: il tessuto adiposo, la sinovia, il derma, il periostio, i denti decidui, il sangue periferico, il sangue mestruale e da organi solidi come fegato, milza e polmone. Queste evidenze hanno permesso di definire le MSCs come una popolazione cellulare quiescente che ha la propria nicchia in tessuti completamente differenziati. A questo proposito molti autori definiscono le MSCs come popolazioni indipendenti di cellule

staminali con la capacità di proliferare indefinitamente pur conservando il loro stato indifferenziato. Per tale motivo l'isolamento delle MSCs comporta in realtà la selezione di un pool cellulare che comprende un sottogruppo eterogeneo di cellule staminali o differenti sottogruppi di staminali e progenitrici.

Data la capacità delle MSCs di differenziarsi e di rilasciare fattori pro-angiogenici, rivestono un ruolo importante nella guarigione delle ferite e nella rigenerazione tissutale<sup>31-32</sup>. È stato ipotizzato che i tumori somiglino a ferite croniche<sup>33</sup> e la presenza delle MSCs in diversi tipi di tumore, conferma questa ipotesi<sup>7</sup>. Si pensa poi che le MSCs siano in grado di interagire con quasi tutte le cellule innate (principalmente cellule dendritiche) e con i sistemi immunitari adattivi (principalmente linfociti T)<sup>34</sup>. La combinazione di questi due tratti straordinari ha indotto ad indagare la possibilità di utilizzare le MSCs come possibili vettori per veicolare agenti antitumorali nel microambiente tumorale, con risultati promettenti riportati in modelli animali rappresentanti differenti tipi tumorali<sup>35</sup>. Si è visto anche che le MSCs possano influenzare la morfologia e la proliferazione cellulare attraverso una combinazione di interazioni tra cellula e cellula ed attraverso la secrezione di citochine chemioattraenti.

Da qui il crescente interesse in ambito internazionale dello studio dell'interazione tra MSCs e cellule tumorali; infatti le MSCs stimolano la crescita tumorale potenzialmente mediata attraverso la loro propensione a secernere una varietà di chemochine tumorigeniche.

## 5. RUOLO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NEL MICROAMBIENTE TUMORALE

Numerosi tipi cellulari compongono il microambiente tumorale tra cui le cellule endoteliali, i periciti, le cellule muscolari lisce, i fibroblasti ed i fibroblasti associati al carcinoma (CAF), i miofibroblasti, i neutrofili, gli eosinofili, i basofili, i mastociti, i linfociti T e B, le cellule natural

killer e le APC come i macrofagi e le cellule dendritiche<sup>36</sup>. Dati sperimentali hanno dimostrato per ciascuno di questi singoli componenti un ruolo nel promuovere la crescita e la progressione neoplastica<sup>37</sup>. Per questo la comprensione della biologia del microambiente tumorale sta acquistando una rilevanza ed un'attenzione paragonabile a quella riservata alla conoscenza del comportamento delle cellule epiteliali neoplastiche<sup>38</sup>. Si è osservato che alcune modifiche della composizione della matrice extracellulare, l'attivazione delle cellule stromali, delle cellule mioepiteliali e il reclutamento di periciti, di cellule muscolari lisce, di cellule immunitarie e infiammatorie sia alla base dei cambiamenti del microambiente che sostengono e promuovono la progressione neoplastica<sup>39</sup>. E' stato osservato che le MSCs sono anche reclutate dallo stroma affinché il tumore cresca<sup>40</sup>, e questo ha portato ad un interesse nello studio del loro potenziale ruolo in questo ambiente. Infatti si è visto che principalmente la produzione paracrina di interleuchina IL-6 possa essere alla base del meccanismo di crescita neoplastica stimolata dalle MSCs<sup>41</sup>. A conferma di questo dato uno studio in vitro ha dimostrato che le MSCs stimolavano l'arresto transitorio del ciclo cellulare tumorale e di una conseguente riduzione del tasso apoptotico. Tuttavia, è stato osservato che l'iniezione concomitante di cellule tumorali e MSCs in topi immunodeficienti portava ad una maggiore e più veloce crescita della popolazione tumorale rispetto al gruppo di controllo in cui venivano iniettate solo cellule tumorali in assenza di MSCs. Questa discrepanza di comportamento in vitro ed in vivo, può essere spiegata ipotizzando che le MSCs possano formare una nicchia di cellule staminali del cancro in cui le cellule tumorali possono preservare il loro potenziale proliferativo sostenendo così il processo maligno<sup>34</sup>.

Le MSCs secernono una vasta gamma di fattori di crescita e citochine che esercitano effetti autocrini e/o paracrini. Queste interazioni possono favorire la neoangiogenesi, avere effetti anti-apoptotici o mitotici, o diminuire la fibrosi o alterare il microambiente cellulare al fine di favorire il differenziamento delle cellule staminali residenti<sup>42-43</sup>. Inoltre, mediante le loro proprietà immunomodulatorie, le MSCs sono in grado di modificare e controllare gli stati

infiammatori nei tessuti danneggiati e/o durante somministrazione in vivo<sup>44</sup>. Le MSCs sono in grado di rilasciare grandi quantità di esosomi, vescicole di membrana (~ 30-100 nm).

Gli esosomi contengono proteine e acidi nucleici che possono facilitare il cross-talk cellulare trasferendo le molecole fondamentali nella carcinogenesi polmonare<sup>45-46</sup>

Si riconoscono due differenti tipi di esosomi: esosomi immunologicamente attivi che partecipano alla presentazione di antigeni, all'attivazione immunitaria, alla soppressione immunitaria e alla sorveglianza immunitaria<sup>47</sup> ed esosomi contenenti carichi genetici che mediano la comunicazione genetica tra le cellule<sup>48-49</sup>. È ben noto che gli esosomi hanno ruoli versatili nel rimodellamento del microambiente tumorale, nella promozione della tumor escape immunitaria e nella progressione tumorale<sup>50</sup>. E' quindi possibile pensare di sfruttare queste vescicole nella diagnosi, nel trattamento e nella valutazione prognostica della patologia neoplastica.

Queste vescicole, che non derivano dalla membrana plasmatica, hanno origine endosomiale mostrando una particolare morfologia e composizione biochimica; infatti il passaggio chiave nella formazione dei corpi multivescicolari (MVB), dai late-endosomi, è il processo di invaginazione inversa. Gli esosomi contengono diversi elementi costitutivi molecolari tra cui proteine e RNA delle cellule di derivazione. Tra questi componenti troviamo anche piccole molecole di RNA non codificante, microRNA (miRNA), che svolgono un ruolo chiave nel mediare funzioni biologiche grazie al loro importante coinvolgimento nella regolazione genica. Il rilascio del contenuto degli esosomi generati dalle MSCs varia a seconda degli stimoli ricevuti dal microambiente cellulare. Attraverso gli esosomi le MSCs trasferiscono fattori terapeutici, in particolare miRNA, alle cellule riceventi modificando l'espressione genica e promuovendo la risposta terapeutica.<sup>51</sup>

## 6. CELLULE MESENCHIMALI PROVENIENTI DA TESSUTO ADIPOSO MEDIASTINICO

Il tessuto adiposo rappresenta una delle fonti di MSCs più comunemente impiegate. I depositi adiposi sottocutanei sono in genere facilmente accessibili da un punto di vista chirurgico attraverso procedure di prelievo mini invasive.<sup>52</sup>

Il numero di cellule che possono essere isolate da una liposuzione sottocutanea è circa  $0.5-2.0 \times 10^6$  cellule/grammo<sup>53-54</sup> di queste la percentuale di staminali varia dall'1 al 10%; ciò dipende in larga misura sia dal donatore che dal sito di prelievo.<sup>55</sup> Ad oggi le proprietà biologiche delle cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo (ADMSCs) sono state studiate senza propriamente valutare se le diverse fonti di origine adiposa in relazione alla loro distribuzione e localizzazione anatomica nel corpo potessero influenzare le differenze intrinseche delle MSCs. Di conseguenza, spesso i risultati ottenuti sono stati incomparabili e talvolta contraddittori, considerando tutte le popolazioni di ADMSCs biologicamente e funzionalmente simili. A tal proposito, alcune evidenze dimostrano che, ad esempio, le ADMSCs derivate da tessuto adiposo addominale sono meno suscettibili all'apoptosi, mentre se derivate da pericardio, omento o inguine esprimono un fenotipo diverso<sup>56-57</sup> Anche la resa cellulare sembrerebbe influenzata dal distretto anatomico di provenienza del tessuto adiposo.<sup>58</sup> Lo sviluppo del tessuto adiposo nei vari distretti anatomici dal punto di vista fisiologico non è un processo univoco; sono infatti molteplici i fattori che cooperano ad orchestrarne la sua diversa distribuzione, quali le variazioni genetiche e le condizioni cliniche. Inoltre, il ruolo fisiopatologico del tessuto adiposo in molti disturbi endocrini e metabolici, quali obesità e diabete, nonché nei tumori è stato ampiamente dimostrato.<sup>59-60</sup> Le ADMSCs sono comunemente coltivate in siero fetale bovino (FBS), nonostante l'elevata presenza di proteine xenogeniche desti dubbi sulle eventuali reazioni immunitarie che si possono verificare nei pazienti dopo eventuale somministrazione di tali cellule.

## 7. ESOSOMI

Gli esosomi sono vescicole extracellulari della grandezza di 30-100 nm secrete da tutti i tipi di cellule<sup>61-62</sup>. Possiamo trovarli in vari fluidi biologici, tra cui sangue, latte materno, urine, secrezioni nasali, lavaggio broncoalveolare, effusioni pleuriche e ascite<sup>63</sup>. Esistono due differenti tipi di esosomi: gli esosomi immunologicamente attivi che partecipano alla presentazione di antigeni, all'attivazione immunitaria, alla soppressione immunitaria e alla sorveglianza immunitaria<sup>64</sup> e gli esosomi contenenti carichi genetici che mediano la comunicazione genetica tra le cellule<sup>65-66</sup>. È ben noto che gli esosomi hanno ruoli versatili nel rimodellamento del microambiente del tumore, nella promozione della *tumor escape* immunitaria e nella progressione tumorale<sup>67</sup>. Possiamo quindi sfruttare gli esosomi per la diagnosi, il trattamento e la valutazione della prognosi del cancro.

### 7a. Biogenesi degli esosomi

Sono stati descritti meccanismi multipli circa la biogenesi degli esosomi. Il meccanismo meglio caratterizzato è quello dipendente dall'ESCRT - *endosomal sorting complexes required for transport*<sup>68</sup>. Questo coinvolge la formazione di endosomi intracellulari, la generazione di corpi multivescolari, la fusione di corpi multivescolari con la membrana plasmatica e il rilascio di esosomi nello spazio extracellulare. La componente centrale della “macchina” ESCRT è composta da quattro complessi proteici e proteine accessorie che legano sequenzialmente futuri esosomi formando vescicole intraluminali<sup>69-70</sup>. Un altro meccanismo di formazione degli esosomi coinvolge la sintesi della ceramide che induce la curvatura delle vescicole stesse. Un terzo meccanismo di biogenesi esosomale è mediato dalla tetraspanina con l'aiuto di proteine come la proteina amiloidea e la proteina premelanosomica<sup>71</sup>. La secrezione di esosomi è influenzata da fattori diversi, quali fattori fisici, fattori chimici e stimoli biologici<sup>72</sup>. I regolatori molecolari del rilascio esosomico comprendono GTPasi, Rab27a, Rab27b, Rab35, Ralα e p53<sup>73-74</sup>. Recentemente, Martinez *et al.*<sup>75</sup> hanno indicato che nella linea cellulare di NSCLC miR-134 e

miR-135b potrebbero regolare YKT6, una molecola chiave nella regolazione del rilascio esosomico. Il ruolo di YKT6 e miR-134 / 135b nel rilascio di esosomi deve essere ancora chiarito.

#### 7b. Componenti molecolari esosomali

Esattamente come le cellule, anche gli esosomi contengono proteine, RNA e DNA<sup>76</sup>. Infatti sono stati identificati all'interno di essi ben 9769 proteine, 3408 mRNA, 2838 miRNA e 1116 lipidi<sup>77</sup>. Dopo il rilascio dalla superficie cellulare, gli esosomi possono fondersi con le membrane plasmatiche delle cellule riceventi e trasferire il loro contenuto nel citoplasma<sup>78</sup>. Così, i componenti degli esosomi sono fattori determinanti nella comunicazione intercellulare.

#### 7c. Proteine esosomali

Sono state condotte ampie analisi per identificare il proteoma degli esosomi. Gli studi proteomici disponibili<sup>79</sup> indicano che numerose proteine sono presenti negli esosomi: alcune di esse partecipano alla biogenesi esosomale, altre alla presentazione degli antigeni, al trasporto di membrana o alla fusione cellulare, altre ancora sono immunoglobuline, proteine di shock termico, integrine e tetraspanine. La composizione degli esosomi varia per tipo di cellule. Huang *et al.*<sup>80</sup> hanno rilevato che l'80% degli esosomi isolati dalle biopsie di NSCLC era EGFR positivo, rispetto al 2% di quello dei tessuti polmonari infiammatori cronici. Inoltre, gli esosomi possono trasferire EGFR alle cellule endoteliali e successivamente attivare sia la via MAPK-mediata che la via Akt-mediata, con conseguente sovraespressione del VEGF e l'aumento della vascolarizzazione tumorale<sup>81</sup>. Recentemente, Li *et al.*<sup>82</sup> hanno esaminato le proteine differenziali esosomali tra le cellule epiteliali bronchiali normali e le cellule di NSCLC utilizzando una strategia proteomica di quantificazione detta Tripla SILAC. I ricercatori hanno evidenziato che proteine di adesione cellulare, proteine di matrice extracellulare, proteasi e proteine di segnalazione cellulare sono presenti esclusivamente negli esosomi rilasciati da cellule di

NSCLC<sup>83</sup>. Inoltre, la traslocazione di ALK-EML4 è stata identificata anche all'interno degli esosomi<sup>84</sup>.

#### 7d. Acidi nucleici esosomali

Tra gli acidi nucleici i primi ad essere stati identificati sono stati i miRNA e gli mRNA; successivamente sono stati trovati anche i lncRNA, i tRNA e gli RNA virali<sup>70</sup>. Oltre all'RNA, sono stati condotti numerosi studi relativi al DNA; Balaj *et al.* e Kahlert *et al.* hanno identificato, rispettivamente, piccoli frammenti di DNA a singolo filamento<sup>85</sup> e grandi frammenti di DNA a doppio filamento<sup>76</sup>. Il ruolo dei miRNA è straordinario, 12 di questi (hsa-miR-17-3p / 21 / 106a / 146 / 155 / 191 / 192 / 203 / 205 / 210 / 212 / 214) sono stati comparati tra campioni di tumore polmonare e tessuti polmonari normali<sup>86</sup>. Sulla base di questa differenza di espressione, Rabinowits *et al.*<sup>87</sup> hanno ulteriormente esaminato il potenziale dei miRNA esosomali come marker diagnostico per il tumore polmonare. Gli studi hanno confermato che i precedenti 12 miRNA sono aumentati in NSCLC e le associazioni di questi 12 miRNA sono state rispecchiate in esosomi circolanti. Recentemente, Giallombardo *et al.*<sup>88</sup>, hanno analizzato, attraverso una qPCR, 8 miRNAs (miR-30b / 30c / 103 / 122 / 195 / 203 / 221 / 222) noti per essere deregolati in NSCLC e hanno scoperto che questi miRNA esosomali sono fortemente diminuiti in caso di esosomi provenienti da cellule di NSCLC rispetto ad esosomi provenienti da cellule di tessuto polmonare sano. Pertanto, questi risultati implicano che i miRNA esosomali potrebbero essere uno strumento utile per comprendere la funzionalità del tumore e possiamo rilevare miRNA esosomali quando il tessuto tumorale non è disponibile per essere biopsizzato in particolar modo nei pazienti che hanno acquisito alcune mutazioni. Fino ad ora non abbiamo dati rilevanti circa lncRNA esosomale nel cancro del polmone. Recentemente, uno studio<sup>89</sup> ha esaminato il coinvolgimento di lncRNA negli esosomi tumorali studiando l'interazione tra lncRNA e mRNA. I colleghi hanno evidenziato che il 9,1% delle proteine codificate da lncRNA e il 9,3% di quelle



provenienti da mRNA avevano un cambiamento di espressione di 2 volte nelle MSCs dopo essere state trattate con esosomi di cellule tumorali polmonari.

#### 7e. Funzione di esosomi nella carcinogenesi polmonare

Gli esosomi contengono numerosi componenti molecolari come proteine e acidi nucleici che possono facilitare il *cross-talk* cellulare trasferendo le molecole fondamentali nella carcinogenesi polmonare<sup>45</sup> (Figura 1).

#### 7f. Esosomi e transizione epitelio mesenchimale (EMT)

La EMT è caratterizzata dalla perdita della forma epiteliale e la successiva acquisizione di fenotipi mesenchimali<sup>90</sup>. È stato ormai chiarito che l'EMT è associata alla trasformazione maligna e alla progressione tumorale<sup>91</sup>. Ci sono due punti che regolano l'EMT: uno è la ridotta espressione delle componenti di adesione, delle componenti della matrice cellulare e delle molecole che partecipano alla polarità delle cellule; l'altra è una maggiore espressione delle proteine di ricostruzione del citoscheletro e di numerose proteasi<sup>61-62</sup>. I cambiamenti nei carichi esosomali coinvolti nella EMT sono stati studiati da Kim *et al.*<sup>92</sup> nelle A549. Non solo il contenuto proteico degli esosomi ( $\beta$ -catenina) ha contribuito al cambiamento nel fenotipo cellulare, ma anche miR-23a è aumentato significativamente. Un altro studio di Rahman *et al.*<sup>93</sup> ha dimostrato che gli esosomi derivati da cellule tumorali a fase tardiva o metastatica possono indurre l'espressione di vimentina e stimolare così la EMT nelle cellule epiteliali umane bronchiali. Questi risultati suggeriscono che gli esosomi derivanti dal tumore potrebbero essere potenziali mediatori della EMT.

#### 7g. Esosomi e trasformazione delle cellule oncogeniche

L'attenzione è stata incentrata sul trasferimento di carichi esosomali che possono attivare il segnale di trasformazione e la trasformazione diretta delle cellule<sup>94</sup>. Ad esempio, si sono sviluppate metastasi polmonari quando i topi sono stati iniettati con cellule F1 e con esosomi,

mentre nessuna metastasi è stata sviluppata quando i topi sono stati iniettati con le sole cellule F1<sup>95</sup>. Un altro studio di Xiao *et al.*<sup>96</sup>, ha dimostrato che gli esosomi derivanti dai mastociti possono trasferire proteine KIT alle cellule A549 e attivare il segnale KIT-SCF, portando ad una maggiore espressione della ciclina D1 e alla proliferazione delle cellule di adenocarcinoma umano del polmone.

#### 7h. Esosomi e angiogenesi

Anche gli esosomi partecipano all'angiogenesi tumorale indotta da citochine e fattori di crescita<sup>97</sup>. Molti studi suggeriscono che gli esosomi derivanti dal tumore possono indurre l'angiogenesi in diversi tumori<sup>98</sup>. Uno studio ha indicato che il miR-21 esosomale potrebbe attivare STAT3, comportando successivamente l'espressione di VEGF e infine l'angiogenesi e la trasformazione maligna delle cellule epiteliali bronchiali umane<sup>99</sup>. Un altro studio, di Zhuang *et al.*<sup>100</sup>, ha dimostrato che attivando il percorso del segnale JAK-STAT, l'RNA esosomale miR-9 potrebbe stimolare l'angiogenesi. Inoltre, Cui *et al.* hanno rivelato che regolando Ephrin A3, il miR-210 derivato da esosomi di A549 potrebbe stimolare l'angiogenesi nelle cellule stromali. Inoltre, Grange C. *et al.*<sup>101</sup> hanno esaminato il ruolo degli esosomi derivanti da carcinoma renale in relazione alla angiogenesi e hanno rilevato che gli esosomi potrebbero promuovere metastasi polmonari aumentando il VEGF-A e le MMP2 / MMP9, migliorando quindi la vascolarizzazione tumorale.

#### 7i. Esosomi, nicchie premetastatiche e metastasi

Recenti evidenze dimostrano che il tumore primario è importante per la formazione di nicchie premetastatiche<sup>102</sup>. Nel frattempo, sono stati identificati esosomi coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare e nel reclutamento di fattori pro-tumorigenici nei siti metastatici secondari<sup>98</sup>. Risultati di Rana *et al.*<sup>103</sup> hanno indicato che gli esosomi derivati dal tumore potrebbero trasferire miRNA per educare i linfonodi selezionati e modulare le cellule pre-metastatiche. Inoltre, i miRNA esosomali derivati dal cancro polmonare (miR-21 / 29a)

potrebbero attivare TLR7 e TLR8 sulle cellule immunitarie, portando all'attivazione di NF- $\kappa$ B e alla liberazione delle citochine infiammatorie prematastatiche. Inoltre, Thorsten Jung *et al.*<sup>104</sup> hanno spiegato che la preparazione prematastatica della nicchia richiedeva due componenti, ovvero gli esosomi con l'assemblaggio delle CD44v delle matrici solubili. Se i carichi esosomali sono associati a metastasi di organi specifici, i risultati di un altro studio<sup>105</sup> hanno indicato che le integrine esosomali  $\alpha 6\beta 4$  e  $\alpha 6\beta 1$  sono implicate nelle metastasi polmonari. Pertanto, il *targeting* delle integrine esosomali potrebbe far diminuire le metastasi polmonari.

#### 7j. Esosomi e la modulazione della risposta immunitaria nel microambiente tumorale

I meccanismi di immunoregolazione degli esosomi includono la modulazione della presentazione dell'antigene, l'attivazione immunitaria, la soppressione immunitaria, la sorveglianza immunitaria e la comunicazione intercellulare<sup>64</sup>. Oltre a possedere la capacità di inibire direttamente la crescita del tumore e aumentare la resistenza allo sviluppo tumorale maligno<sup>106</sup>, gli esosomi liberati da DC e da tumori possono trasportare antigeni tumorali che possono promuovere l'immunità e sradicare in ultima analisi i tumori mediante l'attivazione dei linfociti T CD8+<sup>107</sup>. Un aumento delle evidenze indica che gli esosomi hanno un ruolo importante nella progressione tumorale trasferendo proteine / RNA / DNA e molecole immunitarie soppressive. Fabbri *et al.*<sup>108</sup> hanno dimostrato che nelle cellule immunitarie umane, il miR-21 / 29a esosomale derivato dalle cellule tumorali del polmone potrebbe agire come ligando per il TLR portando in ultima analisi alla crescita tumorale e alla crescita delle metastasi. Pertanto, come agonisti paracrini dei TLR, i miRNA esosomali potrebbero regolare il microambiente tumorale. Inoltre, gli esosomi che esprimono FasL dalla cellula T attivata CD8+ potrebbero attivare i percorsi ERK e NF- $\kappa$ B, con conseguente aumento dell'espressione MMP9 e metastasi polmonari.

## 7k. Esosomi come biomarcatori nel cancro polmonare

Gli esosomi sono stati suggeriti come potenziali strumenti per la diagnosi ed il trattamento tumorale<sup>109</sup>, in quanto sono tumore-specifici, facilmente disponibili nel flusso ematico e sono stabili a 4 ° C per 96 ore o a - 70 ° C per un tempo ancora maggiore. Inoltre, gli esosomi sono protetti dalla degradazione da una doppia membrana lipidica altamente stabile. Pertanto, tutte queste caratteristiche qualificano gli esosomi come potenziali biomarker per la diagnosi precoce e il trattamento personalizzato<sup>76</sup>.

## 7l. Proteine esosomali

Numerose proteine sono state evidenziate sulla superficie della membrana degli esosomi<sup>110</sup>. Finora, sono stati suggeriti CD91, CD317 e EGFR come potenziali marcatori esosomali in NSCLC<sup>111</sup>. Tuttavia, è difficile isolare e studiare esosomi usando l'ultracentrifugazione. Inoltre, la metodologia precedente si concentra solo su un singolo marcatore di esosomi, ora è accettato che sia meglio utilizzarne molti contemporaneamente. Recentemente è stato utilizzato un array di vescicole extracellulari con 37 anticorpi per catturare gli esosomi direttamente dal plasma dei pazienti NSCLC, un altro studio ha utilizzato l'array extracellulare delle vescicole con 49 anticorpi. Non solo poteva valutare la profilassi delle proteine degli esosomi provenienti da differenti stadi e istologia del cancro polmonare, ma anche potenzialmente diagnosticare il cancro del polmone. Fra tutte le 49 proteine esosomali, il marker multiplo della proteina (CD151, CD171 e tetraspanina 8) è stato il più forte marcatore per separare il cancro polmonare di tutti i sottotipi istologici dal gruppo di controllo<sup>112</sup>. Inoltre, il CD151 era correlato con l'aumentata aggressività tumorale. Oltre al sangue, possiamo studiare carichi esosomali provenienti da altri fluidi corporei. Li *et al.* hanno scoperto che l'espressione della glicoproteina  $\alpha$ -2 ricca in leucina, in esosomi urinari e nei tessuti polmonari dei pazienti NSCLC, era in entrambi i casi, più alta di quella del controllo. Park *et al.*<sup>113</sup> hanno isolato esosomi altamente purificati da effusione pleurica maligna in pazienti con NSCLC ed ha

individuato potenziali produttori diagnostici, tra cui EGFR e K-ras. Inoltre, le proteine esosomali possono essere utilizzate anche per predire l'OS. Sandfeld-Paulsen *et al.*<sup>112</sup> hanno mostrato che il marker multiplo della proteina (NY-ESO-1, EGFR, PLAP, EpCam e Alix) è correlato con una bassa OS; e solo NY-ESO-1 è stato associato ad una OS significativamente inferiore. Quindi le proteine esosomali sono potenziali biomarcatori prognostici nel cancro polmonare.

#### 7m. miRNA esosomali

I miRNA circolanti dai tumori polmonari primari e dai corrispondenti tessuti polmonari non cancerosi sono significativamente diversi tra loro, quindi i miRNA hanno un potenziale clinico come marcatori diagnostici<sup>114</sup>. Risultati da Rabinowits *et al.*<sup>111</sup> hanno indicato che sono aumentati 12 miRNA specifici (miR-17-3p / 21 / 106a / 146 / 155 / 191 / 192 / 203 / 205 / 210 / 212 / 214) in caso di NSCLC, suggerendo che possiamo utilizzare miRNA esosomali per riflettere accuratamente il profilo del tumore in assenza di tessuto tumorale. Inoltre, Riccardo *et al.* ha esaminato 742 miRNA esosomali e ha confermato che 4 miRNAs (miR-378a / 379 / 139-5p / 200b-5p) sono presenti in caso di tumore polmonare in pazienti ex fumatori. Inoltre, hanno confermato che 6 miRNA esosomali (miR-151a-5p / 30a-3p / 200b-5p / 629/100 / 154-3p) potrebbero funzionare come marcatori per differenziare pazienti con adenocarcinoma da pazienti con granuloma polmonare<sup>115</sup>. Recentemente, Reclusa P. *et al.*<sup>116</sup> hanno rivelato che la diminuzione dell'espressione di miR-30b e miR-30c esosomali potrebbe essere specifico per l'istotipo di carcinoma a cellule squamose. I dati di cui sopra implicavano che i miRNA esosomali potrebbero essere biomarcatori del recettore del cancro polmonare. È interessante notare che Lai *et al.*<sup>117</sup> ha utilizzato un modello matematico per stabilire un marker multiplo di miRNA (miR-21, miR-205 e miR-155) per il rilevamento precoce di NSCLC. Simile alla proteina esosomale, il livello di espressione esosomale dei miRNA è associato anche al tasso di sopravvivenza dei pazienti con tumore al polmone. Un gruppo di miRNA correlati a EGFR è stato analizzato per valutare la risposta al trattamento da parte dell'osimertinib in EGFR mutato

metastatico NSCLC. Hanno trovato che le espressioni aumentate di onco-miRNAs (hsa-miR-221-3p / 2223p) sono state associate ad un buon esito clinico.

## 8. SCOPO DEL LAVORO

Indagare, in vitro, se il microambiente generato da MSCs derivanti dal tessuto polmonare distante dal tumore o da siti anatomici distanti come quello mediastinico di pazienti con adenocarcinoma (MD-LMSC), ai primi stadi, non metastatico, sia in grado di influenzare in modo differente le proprietà delle cellule primarie di adenocarcinoma polmonare (LAC) rispetto al microambiente generato da MSCs di medesima derivazione tissutale ma proveniente da pazienti affetti da patologia polmonare benigna (BD-L-MSC). Verificando quindi se le MSCs associate o meno al tumore e anatomicamente distanti (ADMSCs) da questo possano riprodurre distinti microambienti in vitro.

## 9. MATERIALI E METODI

### 9 a. Raccolta dei campioni chirurgici e database clinico

Durante interventi di chirurgia toracica sono stati prelevati un piccolo campione di tessuto adiposo mediastinico, di tessuto di parete toracica e di tessuto polmonare sano in 40 pazienti, 20 affetti da patologia benigna (amartocondroma polmonare) e 20 affetti da patologia maligna (adenocarcinoma polmonare non a piccole cellule, NSCLC in stadio T1 N0 M0). Di questi campioni è stato possibile isolare ed ottenere una coltura di MSCs provenienti da tessuto adiposo mediastinico e di parete toracica (ADMSCs) e di MSCs provenienti da tessuto polmonare distante alla lesione di 5 pazienti affetti da patologia benigna e 5 affetti da patologia maligna. Le caratteristiche cliniche dei pazienti coinvolti nello studio sono riassunte in Tabella1. Le procedure chirurgiche sono state condotte presso L'Azienda Ospedaliero Universitaria S.

Andrea, Università di Roma Sapienza. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato alla procedura. La metodologia descritta in questo studio è stata condotta in conformità ai principi della Dichiarazione di Helsinki per gli esperimenti che coinvolgono i tessuti umani. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Sapienza. Tutti i dati sono stati identificati e analizzati in forma anonima.

#### 9 b. Isolamento e coltura MSCs

Le MSCs derivanti dal tessuto polmonare e dal tessuto adiposo mediastinico (LMSCs e ADMSCs) sono state isolate con la tecnica descritta in precedenza<sup>118</sup>. I campioni di tessuto adiposo mediastinico e di tessuto polmonare sono stati trasferiti in tubi da 50 ml e lavati energicamente con PBS senza  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  e soluzione di lisi degli eritrociti (Qiagen). Il tessuto adiposo è stato separato dalla componente vascolare al fine di facilitare la digestione e l'isolamento cellulare. Successivamente, i campioni sono stati frammentati meccanicamente e digeriti in phosphate buffer saline (PBS) contenente 1X tripsina/EDTA (Euroclone) ed 1 mg/ml di collagenasi tipo I (Gibco) a 37°C per 45 minuti in agitazione, scuotendo frequentemente il tubo al fine di disgregare il tessuto. L'azione enzimatica è stata poi bloccata con una soluzione di PBS contenente il 20% di siero fetale bovino (FBS). Per separare la componente cellulare dal digerito totale, i campioni, sono stati filtrati con un filtro da 100  $\mu\text{m}$  (Becton Dickinson, BD) e centrifugati a 335rcf per 5 minuti. Il pellet cellulare è stato trattato con buffer di lisi eritrocitario per eliminare i globuli rossi rimanenti e, dopo averlo lavato due volte in PBS, è stato centrifugato a 335rcf per 5 minuti. Le cellule sono state risospese e piastrate in 4 condizioni di coltura diverse, per identificare quale permettesse una migliore resa proliferativa: • Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1000mg/l di glucosio (basso glucosio) in presenza di 10%FBS • DMEM 1000mg/l di glucosio (basso glucosio) in presenza di 5 U/ml di Eparina e 10% di lisato piastrinico (LP) • DMEM 4500mg/l di glucosio (alto glucosio) in presenza di 10%FBS • DMEM 4500mg/l di glucosio (alto glucosio) in presenza di 5 U/ml di Eparina e 10% di lisato piastrinico

(LP) Tutti i terreni sono stati supplementati con l'aggiunta di 200mM L-glutammina, 100 mM sodio piruvato, amminoacidi non essenziali (NEAA), penicillina ed amfotericina 26 b (Euroclone), le cellule sono state piastrate alla concentrazione di 4000/cm<sup>2</sup> ed incubate a 37°C ed il 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule in sospensione sono state rimosse dopo 72 ore ed il mezzo di coltura è stato cambiato ogni tre giorni. La crescita e la vitalità cellulare sono state valutate tramite Trypan Blue e la migliore resa proliferativa è stata stimata determinando la densità cellulare alla quale corrispondeva una confluenza almeno pari al 90% in piastra. Il passaggio 2 è stato considerato come la soglia minima per considerare una coltura di successo.

#### 9c. Crescita cellulare e vitalità delle MSCs

La crescita cellulare e la vitalità delle ADMSCs sono state valutate mediante l'uso di Trypan blue e quantizzate mediante il contatore di cellule automatico Countness (Life Technology). Il numero di doubling cells è stato calcolato secondo la seguente formula:  $3.322 \log_{10} N/N_0$  (N è il numero finale di cellule ottenute/e N<sub>0</sub> è il numero di cellule piastrate). I terreni condizionati sono stati raccolti tra i passaggi 3-6 e conservati a -80°C. 31 3.6 Saggio clonogenico CFU-F, analisi dell'immunofenotipo e saggio di transdifferenziamento delle ADMSCs Per valutare la capacità clonogenica delle ADMSCs, le cellule a passaggio 0 e successivamente a passaggio 3 sono state risospese in terreno di crescita: DMEM a basso glucosio con 10% FBS o 5 U/mL di eparina ed il 10% LP, alla densità di 40 cellule/cm<sup>2</sup> in piastre Petri. Dopo due settimane di coltura, in cui il mezzo è stato cambiato ogni 72 ore, i cloni cellulari sono stati colorati mediante colorazione Giemsa (Sigma-Aldrich). Le piastre sono state lavate con PBS ed incubate per 2 minuti con il colorante Giemsa puro. Dopo diversi lavaggi in acqua deionizzata, le cellule sono state ulteriormente trattate con una soluzione di Giemsa/ddH<sub>2</sub>O 1:20 per 13 minuti, risciacquate in acqua deionizzata e lasciate asciugare. Una volta asciugate è stata valutata la presenza di cloni cellulari mediante osservazione al microscopio. Per clone cellulare si intende un aggregato di cellule con un diametro >5mm. Il



fenotipo delle ADMSCs è stato valutato a passaggio 0 e 3 mediante analisi citofluorimetrica utilizzando il seguente pannello di anticorpi monoclonali (AcMos) di topo: 0.2mg/ml CD105 (isotipo IgG1, clone 105C02, abcam); 0.1 mg/ml CD44 (isotipo IgG2a, clone F10-44-2, abcam); 0.1 mg/ml CD90 (isotipo IgG1, clone AF-9, abcam); e di anticorpi policlonali di coniglio: 1:100 CD31 (isotipo IgG1, sigmaaldrich), 0.25 mg/ml CD117 (isotipo IgG, abcam), 0.3 mg/ml CD45 (isotipo IgG, abcam), 1 mg/ml CD133 (isotipo IgG, abcam). 2x10<sup>5</sup> cellule sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente (RT) con gli anticorpi sopra elencati. Dopo due lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con gli anticorpi secondari anti-Fc di topo o di coniglio coniugati con il FITC per 30 minuti a temperatura ambiente protetti dalla luce. Le cellule non colorate e trattate solo con gli anticorpi secondari sono state utilizzate come controllo negativo. Le cellule sono state acquisite 32 utilizzando il citofluorimetro FACSCAria (Becton Dickinson) e analizzate mediante il software DiVa (v6.1.1)

#### 9 d. Linee cellulari (A549 e T24)

La linea cellulare A549 (adenocarcinoma polmonare) è stata sviluppata nel 1972 da Giard, attraverso la coltura di tessuto polmonare neoplastico prelevato da un maschio caucasico di 58 anni<sup>119</sup>. In natura, queste cellule epiteliali sono responsabili della diffusione di alcune sostanze, come acqua ed elettroliti, attraverso gli alveoli polmonari. La linea cellulare A549 può essere ancorata o sospesa in una soluzione in vitro. Queste cellule presentano la caratteristica di sintetizzare lecitina e di contenere un elevato livello di acidi grassi insaturi, importanti per mantenere i fosfolipidi delle membrane cellulari. La linea cellulare A549 è ampiamente utilizzata come modello di cellule epiteliali polmonari di tipo II in vitro. Entrambe le linee cellulari sono state mantenute in DMEM High e 10% FBS.

#### 9 e. Condizionamento in vitro delle colture cellulari tumorali con MSC cSPNs

I supernatanti di ADMSC e LMSC ottenuti da pazienti affetti da malattie benigne e da adenocarcinoma sono stati raccolti tra il passaggio 3-6 e quindi conservati a -80°C fino all'uso.

Le linee cellulari di A549 sono state condizionate, rimuovendo il mezzo originale e sostituendolo con supernatanti di ADMSC cSPNs o LMSC cSPNs.

- Saggio di proliferazione – MTS assay

L'effetto dei mezzi condizionati sulla vitalità delle cellule tumorali è stato valutato con il saggio MTS (CellTiter 96 AQueus One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Milano, Italia). L'MTS è un metodo che permette di determinare il numero di cellule vitali in presenza di un agente citotossico. Il composto tetrazolico dell'MTS la cui formula chimica è 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio, è un sale che viene ridotto solo dalle cellule biologicamente attive, producendo un prodotto colorato solubile nel terreno di coltura, il formazano. La molecola, quindi, viene metabolizzata dalle deidrogenasi mitocondriali delle cellule metabolicamente attive, la quantità di formazano prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule vive. Essendo immediatamente solubile, permette di effettuare un test colorimetrico leggendo l'assorbanza a 492 nm avendo così una stima delle cellule vitali presenti in coltura.

Le linee cellulari LAC (cellule primarie di adenocarcinoma polmonare), A549 e T24 sono state seminate su piastre da 96 pozzetti (150 cellule/pozzetto) e incubate per 24 ore in mezzo completo per consentire l'adesione. Il giorno dopo, le cellule sono state condizionate con i supernatanti derivati dalle MSCs. Le cellule trattate con mezzo completo sono state usate come controllo. A 0, 3, 5 e 7 giorni dopo il trattamento, 20  $\mu$ M di reagente MTS è stato aggiunto al pozzetto per 2 ore a 37 ° C, dopo di che l'assorbanza è stata misurata tramite un lettore di micropiastre (492 nm). I risultati sono stati espressi come percentuale del controllo e normalizzati al giorno 0. Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti in quintuplicato.

- Saggio di migrazione

Un'evoluzione molto comune nella maggior parte dei tumori solidi maligni è quella di invadere altri tessuti o organi che non necessariamente siano vicini all'organo da cui parte il tumore primitivo. Molte cellule del nostro organismo hanno la capacità di muoversi da un distretto ad un altro e spesso questa capacità coincide con la loro funzione biologica, ma quando a farlo sono le cellule tumorali maligne, questa capacità le porta ad invadere e colonizzare altri tessuti con la formazione di metastasi. Il transwell assay è un test che ci permette di valutare la capacità di migrazione cellulare, le cellule A549 ( $5 \times 10^3$ /pozzetto) sono state placcate in un mezzo libero in siero nella camera superiore di Boyden (filtro Transwell - pori da  $8\mu\text{m}$ , B & D, Milano, Italia). Il mezzo completo (controllo) o i supernatanti derivati da MSCs sono stati aggiunti alla camera inferiore come chemoattraenti. Dopo 8 ore di incubazione, il lato interno dell'inserito è stato rimosso e lavato con PBS quindi macchiato con 0,25% di Crystal violet (Sigma, Milano, Italia). Dieci campi/camera sono stati contati sotto un microscopio (10x). L'indice di migrazione (%) è stato normalizzato su FBS ed espresso come rapporto: numero di cellule migrate / numero di cellule placcate. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte.

- Saggio di formazione di cloni

Il saggio clonogenico è stato utilizzato per determinare la sopravvivenza cellulare, determinando quindi la capacità di una cellula di proliferare indefinitivamente, attraverso la formazione di cloni. Indica la capacità delle cellule di produrre una progenie, cioè una singola cellula che forma una colonia di 50 e più cellule (un agglomerato di cellule  $> 5\text{ mm}$  di diametro, visibile a occhio nudo). Attraverso una curva di sopravvivenza, si può descrivere il fenomeno della relazione tra insulto-riproduzione e la percentuale di cellule che sopravvivono. La capacità di una singola cellula di crescere in una grande colonia visibile ad occhio nudo è la prova che ha mantenuto la sua capacità di riprodursi.

Le A549 sono state seminate a bassa densità (300 cellule/60mm piastra di Petri) con supernatanti derivati da MSCs e incubati per 14 giorni a 37 ° C. Le cellule coltivate con mezzo completo sono state usate come controllo. Le colonie prodotte sono state fissate con 4% di paraformaldeide e poi macchiate con 0,005% di Crystal Violet (Sigma, Milano, Italia) per 1 ora e contate con un microscopio ottico.

Sono state testate attraverso questo esperimento le cellule LAC e le T24 cresciute in normossia trattate con MD-LMSC cSPNs, MD-ADMSC cSPNs, BD-LMSC cSPNs, BD-ADMSC cSPNs e un non trattato (NT) come controllo interno del processo. Sono state seminate: una piastra con le LAC, che non è stata trattata con alcun supernatante proveniente dalle MSCs ed è stata lasciata come controllo interno; una piastra con le LAC trattata con MD-LMSC cSPNs; una piastra con le LAC trattata con MD-ADMSC cSPNs; una piastra con le LAC trattata con BD-LMSC cSPNs ed una piastra con le LAC trattata con BD-ADMSC cSPNs. Sono state poi seminate le T24: una piastra con le T24 che non è stata trattata con alcun supernatante proveniente dalle MSCs ed è stata lasciata come controllo interno; una piastra con le T24 trattata con MD-LMSC cSPNs; una piastra con le T24 trattata con MD-ADMSC cSPNs; una piastra con le T24 trattata con BD-LMSC cSPNs ed una piastra con le T24 trattata con BD-ADMSC cSPNs.

Si è poi condotta la crescita in coltura di fibroblasti polmonari di paziente affetto da tumore maligno e si è provveduto alla sospensione del supernatante di questa coltura (MD-LFIBRO cSPNs). Cellule di A549 sono state piastrate e condizionate con MD-LFIBRO cSPNs. Dallo stesso paziente sono state prelevate anche MSCs sia dal tessuto polmonare che dal tessuto adiposo mediastinico con messa in coltura e creazione di supernatante che è stato poi usato come condizionante di due piastre di A549.

Tutte le cellule sono state lasciate crescere per 14 giorni in termostato a 37°C. I mezzi di coltura sono stati sostituiti ogni 4 giorni e l'esperimento condotto per tre volte., Le piastre vengono lavate con PBS, quando il terreno viene rimosso. Si colorano poi i cloni con Crystal

violet diluito in acqua in rapporto 1:1 e si lascia per 30 minuti. Lavando abbondantemente con acqua si sciacquano le piastre, poi vengono capovolte e lasciate asciugare. Si contano poi le i cloni formatisi con il microscopio.

- Analisi del profilo delle citochine

La rilevazione simultanea di citochine/fattori di crescita in campioni condizionati derivanti da MSCs è stata eseguita attraverso il Cytokine Antibody Array C5 umano (Ray Biotech, Inc.) secondo le istruzioni del produttore. Una quantità uguale di proteine (1 mg/ml) è stata caricata nell'array. I campioni sono stati normalizzati su FBS.

E' stata eseguita valutazione della produzione di *reactive oxygen species* (ROS) (kit) su colture di ADMSC provenienti dal tessuto adiposo mediastinico e dal tessuto adiposo della parete toracica di pazienti affetti da patologia benigna e maligna, sia con aggiunta di terreno di coltura lisato piastrinico (PL) che con FBS.

- Metodi analisi esosomi e A549

Le cellule A549 sono state seminate e contate ( $3 \times 10^6$  cellule/piastre di coltura da 100 mm). Dopo 5 giorni i supernatanti sono stati raccolti e centrifugati a 500g per 10 minuti, 2000g per 10 minuti e 100000g per 60 minuti. Alla fine dell'ultimo spin, i supernatanti sono stati scartati e le microvescicole con gli esosomi utilizzate per le successive analisi.

- RT-qPCR

Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto usando il kit *innuPREP RNA Mini Kit* della ditta *AnalytikJena*. Il kit prevede di lavorare con un massimo di  $5 \times 10^6$  cellule; si inizia con la lisi cellulare aggiungendo 400 µl di soluzione di lisi, incubare per 2 minuti a temperatura ambiente, si risospende e poi bisogna fare una seconda incubazione a temperatura ambiente per 3 minuti; per

togliere il DNA si utilizza un primo filtro, si centrifuga a 10.000g per 2 minuti e si aggiunge in egual volume (approssimativamente 400 µl) etanolo al 70%. Per selezionare l'RNA rimanente, si usa un secondo filtro, e si centrifuga a 10.000g per 1 minuto; si lava il campione con 500 µl di High Solution, si centrifuga a 10.000g per 1 minuto, si aggiunge 750 µl di Washing Solution e si centrifuga nuovamente a 10.000g per 1 minuto; per rimuovere l'etanolo, si toglie il secondo filtro, si aggiunge un terzo filtro e si centrifuga a 10.000g per 3 minuti; per l'eluizione, si utilizza un terzo filtro che andrà posizionato nel tubo di eluizione, si aggiunge 30-80 µl di RNasi-free water, incubare 1 minuto a temperatura ambiente e si centrifuga a 6.000g per 1 minuto.

### Retrotrascrizione RNA

Successivamente all'estrazione, è stato quantificato l'RNA mediante lo spettrofotometro NanoDrop. 1 µg di RNA è stato utilizzato per retrotrascrivere 1 µg di cDNA (DNA copia) mediante il kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* della ditta *AppliedBiosystems*. Il kit prevede l'utilizzo di: 2,0 µl di 10X RT Buffer, 0,8 µl di 25X dNTP Mix (100 mM), 2,0 µl di 10X RT Random Primers, 1,0 µl di MultiScribe™ Reverse Transcriptase; 4,2 µl di Nuclease-free H<sub>2</sub>O per un volume totale di 10 µl di prodotto. Un primo step di 10 minuti comporta una temperatura di 25°C, successivamente 120 minuti a 37°C, si passa poi a 85°C per 5 minuti, per concludere a 4°C. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

### Quantitative PCR (qPCR)

A questo punto, con il cDNA ottenuto, è possibile procedere alla RT-qPCR utilizzando, nello specifico caso, il SYBR Green come marcatore fluorescente. Questo fluorocromo emette la fluorescenza con maggiore intensità quando intercalato al DNA a doppia elica; con il procedere dei cicli d'amplificazione si assisterà ad un aumento progressivo della fluorescenza fino al ciclo in cui il valore base, fornito dal nostro gene costitutivo di riferimento, viene superato. Questo "passaggio" viene indicato come CT (*cycle threshold*).

Per effettuare la qPCR è stata preparata una miscela Master Mix composta dai quantitativi di sostanze di seguito elencate, moltiplicate per il numero di campioni da analizzare: 5µl di SYBR Green, 0,5 µl di Primer (Forward + Reverse), 3,5 µl di H<sub>2</sub>O, 1 µl di cDNA diluito 1:8, per un volume totale in ogni pozzetto di 10 µl di soluzione. A questo punto le provette sono state inserite nel software impostato secondo un tipico profilo termico (Figura 16).

Una volta amplificati, i campioni sono stati successivamente riscaldati ed è stata monitorata la variazione dell'energia di fluorescenza affinché fosse possibile generare una curva di dissociazione. Mediante questa metodica, è stata analizzata quantitativamente l'espressione dei geni di seguito descritti:

- **18S:** L'RNA ribosomale 18S (rRNA abbreviato 18S) è una parte dell'RNA ribosomale. La lettera S rappresenta le unità Svedberg. L'rRNA 18S fa parte della piccola subunità ribosomale eucariotica (40S).
- **B23:** noto anche come nucleofosfoproteina B23 o numatrina, è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene NPM1. B23 è associato a strutture ribonucleoproteiche nucleari e lega gli acidi nucleici a singolo e a doppio filamento. È coinvolto nella biogenesi dei ribosomi e può aiutare piccole proteine basiche nel loro trasporto al nucleolo. Durante lo sviluppo tumorale, le cellule neoplastiche aumentano la produzione di ribosomi per supportare il tasso più elevato di sintesi proteica associata alla crescita del cancro. Questo è sostenuto dall'aumento della sintesi di rRNA trascritta nel nucleolo da parte dell'RNA polimerasi I e correlata con prognosi avverse. Per contrastare questo meccanismo, i prodotti di Rb e p53, due importanti geni di soppressione tumorale, interferiscono negativamente con l'RNA polimerasi I e con l'assemblaggio del macchinario trascrizionale sul promotore rDNA. L'attivazione di p53 è sotto il controllo diretto del regolatore negativo MDM2, che a sua volta è inattivato da ARF. Ciò spiega perché l'ARF è indispensabile per innescare l'arresto del ciclo cellulare e il programma

apoptotico dopo segnali da parte degli oncogeni. B23 coinvolge ARF all'interno del nucleolo, ritardando il suo fatturato. Di conseguenza, l'inibizione di B23 da parte di shRNA ha effetti destabilizzanti su ARF. Nei fibroblasti embrionali a livello di mouse (MEF) che non dispongono sia di B23 che p53, ARF si trova principalmente al di fuori del nucleolo e con una riduzione dell'emivita, conferendo alle cellule una maggiore velocità di proliferazione. B23 è una proteina abbondante e multifunzionale presente ad alta quantità nella regione granulare dei nucleoli. È coinvolto nella regolazione della biogenesi dei ribosomi e nel controllo della stabilità e della sopravvivenza del genoma in risposta a una varietà di stimoli di stress.

- **Egr-1:** studi condotti da Liu C. *et al.*<sup>120</sup>, dimostrano che il fattore di trascrizione Egr-1 è un potenziale regolatore di oltre 30 geni e svolge un ruolo nella crescita, nello sviluppo e nella differenziazione cellulare e, inoltre, ha una significativa attività di soppressione della trasformazione. Egr-1 contiene tre motivi zinc-finger nella parte C-terminale della molecola costituendo il dominio di legame del DNA e interagiscono con i promotori in virtù di due classi di elementi ricchi di GC: singoli elementi GC (GCE) 5'-TGCGT/gG/AGGC/a/tGG/T-3' e siti sovrapposti costituiti da un sito di legame Sp-1. D'altra parte, studi di modelli e linee tumorali umane rivelano che Egr-1 ha significativi ruoli di crescita e di soppressione della trasformazione. Studi recenti dimostrano che questo effetto può essere considerato dalla capacità di Egr-1 di indurre l'espressione e la secrezione di TGF- $\beta$ 1, un potente soppressore di crescita di molti tipi di cellule, legandosi a una singola GCE del promotore TGF- $\beta$ 1.
- **VEGF:** il fattore di crescita dell'endotelio vascolare indica una specifica sottofamiglia di fattori di crescita coinvolti sia nella vasculogenesi (intesa come genesi ex novo di un sistema circolatorio in età embrionale), sia nell'angiogenesi (la formazione di vasi da strutture già esistenti). La proteina più importante di questa categoria è il VEGF-A, in



origine chiamato VEGF prima della scoperta delle altre proteine della stessa famiglia, questa è importante per l'angiogenesi, la migrazione e la mitosi delle cellule endoteliali, la creazione del lume dei vasi sanguigni, la creazione di fenestrazioni nei capillari, la chemiotassi di macrofagi e granulociti, la vasodilatazione (mediante il rilascio di ossido nitrico). Ne fanno parte anche la PlGF (proteina placentare coinvolta nello sviluppo prenatale), VEGF-B (per l'angiogenesi embrionale), VEGF-C (per la linfangiogenesi), VEGF-D (necessario per lo sviluppo della circolazione linfatica attorno ai bronchioli polmonari) e PlGF (importante per la vasculogenesi e implicato nell'angiogenesi in caso di ischemia, infiammazione, riparazione delle ferite e neoplasie).

- **N-cadherin:** originariamente chiamato così per il suo ruolo nel tessuto neurale, successivamente è stato trovato anche a svolgere un ruolo nel muscolo cardiaco e nelle metastasi del cancro. N-caderina è una glicoproteina omofilica transmembrana appartenente alla famiglia di molecole di adesione delle cellule dipendenti dal calcio. Queste proteine hanno domini extracellulari che mediano interazioni tra le cellule adiacenti e le code C-terminali citoplasmatiche mediano il legame con le catenine, che a loro volta interagiscono con l'actina citoscheletrica. La N-caderina si trova comunemente nelle cellule tumorali e fornisce un meccanismo per la migrazione transendoteliale. Quando una cellula tumorale aderisce alle cellule endoteliali di un vaso sanguigno, essa regola il pathway di *src*, che fosforilizza le  $\beta$ -catenine attaccate sia ad N-caderina che a E-caderina. Ciò provoca il fallimento della connessione intercellulare tra due cellule endoteliali adiacenti e permette alla cellula tumorale di muoversi.
- **E-cadherin:** la funzione principale si esplica nelle giunzioni ancoranti (dette anche *anchoring junctions*) che sono strutture di contatto delle cellule che servono a mantenere un equilibrio meccanico nel tessuto in cui sono presenti. Tra le E-caderine più importanti abbiamo le placoglobine e le desmoplachine. Queste proteine strutturali si

legano a proteine filamentose come ad esempio la desmogleina e la desmocollina che a loro volta si legano alle ABP (*actin binding protein*) che sono appunto proteine deputate all'ancoraggio dell'actina (actinina A, miosina e tropomiosina). Queste strutture nel loro complesso vengono chiamate desmosomi e sono appunto caratterizzate dall'avere come proteine costitutive delle E-caderine a differenza di strutture come gli emidesmosomi, che invece collegano metabolicamente e meccanicamente l'epitelio basale e una membrana basale, e che hanno come proteine costitutive non E-caderine ma integrine anch'esse leganti le ABP. Un deficit a carico dei geni responsabili dell'espressione delle componenti riguardanti la E-caderina, e quindi la sua non produzione, può creare una condizione predisponente all'insorgenza di neoplasie di origine epiteliale (es. Adenocarcinoma polmonare), facilitando il processo metastatico della lesione.

- **Snail1:** è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene *SNAI1*, è una famiglia di fattori di trascrizione che promuovono la repressione della E-caderina per regolare la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) durante lo sviluppo embrionale e durante il processo di cancerogenesi.
- **Vimentina:** essa fa parte della famiglia delle proteine dei filamenti intermedi i quali sono importanti componenti strutturali delle cellule eucariotiche. Essi, insieme ai microtubuli e ai microfilamenti di actina, costituiscono il citoscheletro. Questo filamento è utilizzato come marcatore di tessuti derivati dal mesoderma e come tale può essere utilizzato come marcatore immunoistochimico per i sarcomi. La vimentina è attaccata al nucleo, al reticolo endoplasmatico e ai mitocondri, sia lateralmente che terminalmente. Si conclude che la vimentina giochi un ruolo significativo come supporto e ancoraggio degli organelli nel citosol. La natura dinamica della vimentina è importante perché offre flessibilità alle cellule, fornendo loro una resistenza assente nella rete dei microtubuli e dell'actina, in condizioni di stress meccanico in vivo. Quindi, in generale, è accertato che

la vimentina è la componente citoscheletrica responsabile del mantenimento dell'integrità cellulare (cellule senza vimentina sono estremamente delicate quando disturbate con una micropuntura). I risultati di uno studio sui topi transgenici non in grado di produrre la vimentina hanno mostrato che i topi erano funzionalmente normali. Anche se il risultato potrebbe essere sorprendente, è possibile che la rete dei microtubuli abbia compensato l'assenza della rete intermedia. Questo rinforza l'idea dell'intima interazione tra i microtubuli e la vimentina. Inoltre, in presenza di depolimerizzatori dei microtubuli, è stata osservata una riorganizzazione della vimentina, che implica ancora una volta una relazione tra i due sistemi. In sostanza, la vimentina è responsabile del mantenimento della forma cellulare, dell'integrità del citoplasma e della stabilizzazione delle interazioni citoscheletriche.

- **IL-1 $\alpha$** : nota anche come ematopoietina-1, è una citochina codificata dal gene IL1A. In generale, essa è responsabile della attivazione dell'infiammazione, così come la promozione della febbre e della sepsi. Gli inibitori di IL-1 $\alpha$  sono stati sviluppati per interrompere tali processi e trattare diverse patologie. IL-1 $\alpha$  è prodotta principalmente da macrofagi attivati, neutrofili, cellule epiteliali e cellule endoteliali. Possiede attività metaboliche, fisiologiche, ematopoietiche e svolge uno dei ruoli centrali nella regolazione delle risposte immunitarie, attivando anche il TNF- $\alpha$ . In vitro, tale citochina, stimola i cheratinociti e i macrofagi, induce la sintesi del pro-collagene di tipo I e III, provoca la proliferazione dei fibroblasti, induce la secrezione di collagene, induce riarrangiamenti citoscheletrici, induce la secrezione di IL-6 e G-CSF, induce la sintesi della cicloossigenasi e la liberazione di prostaglandina PGE2, causa la fosforilazione delle *heat shock protein*, provoca la proliferazione delle cellule muscolari lisce, dei cheratinociti e stimola il rilascio di altre citochine dirette ai cheratinociti, induce la liberazione di TNF $\alpha$  da cellule endoteliali e rilascia Ca<sup>2+</sup> da parte degli osteoclasti, stimola gli epatociti per la secrezione di proteine di fase acuta, induce la proliferazione

delle cellule CD4+, la produzione di IL-2, co-stimola le cellule CD8 +/IL-1R+, induce la proliferazione di cellule B mature e la secrezione di immunoglobuline, uccide un numero limitato di tipi di cellule tumorali.

- **IL-1 $\beta$** : è una proteina codificata dal gene IL1B. Il precursore IL-1 $\beta$ , mediante una caspasi citosolica (IL-1 $\beta$ -convertasi), diventa IL-1 $\beta$  matura. Questa citochina è un importante mediatore della risposta infiammatoria ed è coinvolto in una varietà di attività cellulari, tra cui la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi. L'induzione della cicloossigenasi-2 (PTGS2/COX2) con questa citochina nel sistema nervoso centrale (SNC) contribuisce all'ipersensibilità del dolore infiammatorio.
- **IL-6**: proteina trascritta dal gene IL6, è un'interleuchina che agisce come citochina multifunzionale, sia pro-infiammatoria, sia anti-infiammatoria. È secreta dai linfociti T e dai macrofagi per stimolare la risposta immunitaria, ad esempio durante un'infezione o in seguito ad un trauma come una scottatura o altri danni tissutali che portino ad infiammazione. Il ruolo dell'IL-6 nella risposta agli agenti patogeni è stato confermato da esperimenti sui topi nei quali cavie prive di IL-6 mostravano una minore capacità di resistere ad infezioni di *S. Pneumoniae*. Essa è anche una "miochina", ovvero una citochina prodotta dal muscolo, e la sua concentrazione aumenta in risposta alla contrazione muscolare. In particolare è significativamente aumentata dall'esercizio fisico e precede la comparsa in circolo di altre citochine. In particolare si ritiene che durante l'esercizio fisico agisca in modo simile ad un ormone per mobilizzare substrati extracellulari e/o aumentare l'apporto di sostanze nutritive al muscolo. Anche le cellule muscolari lisce delle tonaca media di molti vasi producono l'IL-6 come citochina pro-infiammatoria. Il ruolo dell'interleuchina 6 come citochina antinfiammatoria, infine, è dato dal suo effetto inibitorio su TNF- $\alpha$  ed IL-1 e dall'attivazione dell'interleuchina 10 e dell'IL-1Ra<sup>121</sup>. La IL-6 è uno dei più importanti mediatori della febbre e delle risposte di

fase acuta. È in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e iniziare la sintesi di PGE2 nell'ipotalamo, provocando quindi l'aumento della temperatura corporea. Un altro meccanismo mediante il quale l'IL-6 provoca l'aumento di temperatura corporea è l'attivazione del catabolismo dei substrati energetici nei muscoli e nel tessuto adiposo. L'IL-6 può essere secreta dai macrofagi in risposta a specifiche molecole microbiche note come PAMP (*pathogen associated molecular patterns*). I PAMP legano un gruppo di recettori importanti del sistema immunitario innato, i PPR, a cui appartengono i recettori *Toll-like*. Questi recettori sono presenti sulla superficie cellulare e, quando legano un antigene, danno luogo ad una cascata di segnali che dà origine alla produzione di citochine infiammatorie. L'IL-6 stimola la sintesi delle proteine di fase acuta e la produzione di neutrofili nel midollo osseo. Favorisce la crescita dei linfociti B ed è antagonista dei linfociti T regolatori (anche noti come *T-suppressor*). L'IL-6 svolge un ruolo importante in numerose patologie tra cui diabete, aterosclerosi, depressione, malattia di Alzheimer, tumore prostatico, Lupus eritematoso sistemico e artrite reumatoide. È stato inoltre evidenziato che pazienti con cancro metastatico hanno livelli di IL-6 nel sangue aumentati. C'è quindi interesse nello sviluppo di agenti anti-IL-6 come agenti terapeutici per diverse patologie. Il primo di questi farmaci è stato il *tocilizumab* che ha ottenuto l'approvazione all'immissione in commercio per il trattamento dell'artrite reumatoide. Un altro, l'*ALD518*, è in fase di sviluppo clinico.

- **IL-8:** è una chemochina prodotta dai macrofagi e da altri tipi cellulari come le cellule epiteliali. È sintetizzata anche dalle cellule endoteliali, che immagazzinano IL-8 nelle loro vescicole di secrezione, i corpi di Weibel-Palade. Nell'uomo, l'IL-8 è codificata dal gene IL8. Esistono molti recettori di superficie capaci di legare l'IL-8; i tipi più studiati sono i recettori accoppiati a proteine G CXCR1 e CXCR2. L'espressione e l'affinità per IL-8 è diversa per i due recettori (CXCR1 > CXCR2). I rettori di tipo Toll sono i recettori del sistema immunitario innato. Questi recettori riconoscono pattern di antigeni (come il

LPS dei batteri gram negativi). Attraverso una sequenza di reazioni biochimiche, IL-8 viene secreta ed è un importante mediatore della risposta immunitaria innata; conosciuta anche come fattore chemotattico per i neutrofili, induce chemotassi delle cellule bersaglio, in primo luogo neutrofili ma anche altri granulociti, che in questo modo migrano verso il sito di infezione, induce anche fagocitosi da parte degli stessi. L'IL-8 è anche conosciuta per essere un potente promotore dell'angiogenesi. Nelle cellule bersaglio, l'IL-8 induce una serie di risposte fisiologiche richieste per la migrazione e la fagocitosi, come aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, esocitosi (per es. rilascio di istamina) e *burst* ossidativo. L'IL-8 è spesso associata ad infiammazione. Ad esempio, è stata identificata come mediatore pro-infiammatorio nella gengivite e nella psoriasi. Poiché la secrezione di IL-8 è aumentata dallo stress ossidativo, che a sua volta fa sì che il reclutamento di cellule infiammatorie provochi un ulteriore aumento di mediatori di stress ossidativo, la rende un parametro chiave nell'infiammazione localizzata.

- **IL-10:** è una citochina anti-infiammatoria. IL-10 è un dimero con 6 domini ad  $\alpha$ -elica presenti su ciascun monomero che si legano non covalentemente con l'altro monomero. Il suo recettore, IL-10R fa parte dei recettori per citochine di tipo II e sul versante citoplasmatico è associato a Jak1 e a Tyk2 che trasducono il segnale mediante STAT3. IL-10 è prodotta principalmente dai monociti, dai linfociti T regolatori e dai linfociti  $\text{Th}_2$ . È in grado di inibire la sintesi di citochine pro-infiammatorie quali  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-2, IL-3,  $\text{TNF-}\alpha$  e GM-CSF, prodotte da cellule quali macrofagi e linfociti T helper di classe 1. I macrofagi che la producono vengono inattivati tramite un feedback negativo, stimola invece la proliferazione dei linfociti B e la produzione di anticorpi a carico delle plasmacellule. Inoltre, ha mostrato anche un ruolo importante nella soppressione della capacità di presentazione dell'antigene da parte delle cellule APC, questo a causa di un effetto depressivo nella produzione di molecole MHC II.

- **TNF- $\alpha$ :** è una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica ed è membro di un gruppo di citochine che stimolano la reazione della fase acuta. È prodotta principalmente dai macrofagi, sebbene possa essere prodotta da Linfociti T CD4+, cellule NK, neutrofili, mastociti, eosinofili e neuroni. Il principale ruolo del TNF è nella regolazione delle cellule del sistema immunitario. Il TNF- $\alpha$ , essendo un pirogeno endogeno, è capace di indurre febbre, morte apoptotica, cachessia ed infiammazione. È capace di inibire la carcinogenesi e la replicazione virale e di rispondere in caso di sepsi attraverso la produzione cellulare di IL-1 e IL-6. Il TNF- $\alpha$  viene talvolta detto anche cachessina o cachectina. Difetti nella produzione di TNF- $\alpha$  sono implicate nell'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer, cancro, depressione maggiore e malattie infiammatorie croniche intestinali. Agisce sull'ipotalamo stimolando l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene aumentando il rilascio di CRH (ormone di rilascio della corticotropina), sopprime l'appetito (cachessia), induce la febbre (funziona da pirogeno endogeno, inducendo l'ipotalamo a produrre prostaglandine); sul fegato stimolando la risposta di fase acuta, portando all'aumento delle proteine di fase acuta come la proteina C-reattiva e altre, induce insulino-resistenza promuovendo la fosforilazione della serina del substrato recettoriale dell'insulina-1 (IRS-1) che blocca il sistema di segnalazione dell'insulina (ad alte concentrazioni di TNF- $\alpha$  sopravviene iperglicemia); attrae potentemente neutrofili e li aiuta ad agganciarsi alle cellule endoteliali per extravasare; sui macrofagi stimola la fagocitosi, la produzione di ossidanti dell'IL1 e prostaglandine lipidiche infiammatorie E2 PGE2; sul sistema cardiocircolatorio fa diminuire la pressione andando ad aumentare la vasodilatazione, diminuire la contrattilità del miocardio, indurre la formazione di trombi (creando la cosiddetta C.I.D. ossia coagulazione intravascolare disseminata); su altri tessuti aumenta la resistenza all'insulina, aumenta il catabolismo proteico nel muscolo e quello lipidico nel tessuto adiposo, induce l'apoptosi di vari tipi cellulari. Un aumento locale della concentrazione di TNF- $\alpha$  causa i segni tipici dell'infiammazione:

rubor, dolor, calor, tumor, functio laesa. Alte concentrazioni plasmatiche di TNF- $\alpha$  possono causare shock settico, con MOF: multi organ failure e, di conseguenza, morte. La prolungata esposizione a basse concentrazioni di TNF- $\alpha$  può portare a cachessia, una sindrome che porta alla deplezione del patrimonio proteico e lipidico dei tessuti (in particolare muscolare e adiposo). Questo tipo di risposta si riscontra nei pazienti affetti da tumore. È stato dimostrato, nel topo, che la secrezione di TNF- $\alpha$  da parte delle cellule del Sertoli abbia un ruolo fondamentale nell'apertura temporanea e nella riformazione delle giunzioni occludenti della barriera emato-testicolare durante la migrazione degli spermatoцитi dal compartimento basale verso quello luminale. Due recettori, TNF-R1 (recettore per il TNF di tipo 1; CD120a; p55/60) e TNF-R2 (recettore per il TNF di tipo 2; CD120b; p75/80) si legano al TNF- $\alpha$ . TNF-R1 è espresso costitutivamente nella maggior parte dei tessuti e può essere attivato completamente sia dalla frazione di TNF legata alla membrana sia dalla forma trimERICA solubile. Invece, il TNF-R2 si trova solo nelle cellule del sistema immunitario e risponde solo alla forma omotrimerica integrale del TNF. Dopo il contatto con i loro ligandi, i recettori formano, anch'essi, trimeri. Ciò provoca un cambiamento conformazionale, portando alla dissociazione della proteina inibitoria SODD dal dominio intracellulare detto "di morte" (Death Domain, DD). In tal modo la proteina adattatrice TRADD è in grado di legarsi al DD, servendo appunto da adattatrice per successive proteine. Legata TRADD, possono iniziare tre diverse vie biochimiche: 1) attivazione di NF- $\kappa$ B: TRADD recluta TRAF2, che recluta a sua volta un complesso proteico a funzione chinasi detto IKK, che può essere attivato (fosforilato) da un'altra serina-treonina chinasi RIP. Una proteina inibitoria I $\kappa$ B $\alpha$  che normalmente è legata a NF- $\kappa$ B e inibisce la sua traslocazione nel nucleo è fosforilata da IKK e può essere degradata, rimane così libero NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B è un fattore di trascrizione eterotrimerico che, traslocato nel nucleo, media la trascrizione di un vasto numero di proteine coinvolte nella sopravvivenza cellulare e nella proliferazione,



nella risposta infiammatoria, nella funzione anti-apoptotica; 2) attivazione della via della MAP-chinasi: delle tre maggiori cascate enzimatiche iniziate dalla MAPK, il TNF- $\alpha$  induce una forte attivazione di quella legata allo stress del gruppo JNK, evoca invece una moderata risposta della via p38-MAPK e infine una attivazione minimale della via classica di ERK. TRAF2 attiva le chinasi MEKK1 e ASK1, prime induttrici della via JNK; e queste due fosforilano MKK7 che finalmente attiva JNK. Esso entra nel nucleo e attiva fattori di trascrizione come c-Jun e ATF2. La via di JNK è coinvolta nel differenziamento cellulare, nella proliferazione ed è generalmente pro-apoptotica; 3) induzione di segnali di morte: come tutti i membri della superfamiglia del TNFR che contengono domini di morte (DD), TNF-R1 è coinvolta nel processo di morte cellulare programmata<sup>122</sup>. Tuttavia, la capacità di indurre la morte cellulare è scarsa se comparata a quella di altre molecole della stessa famiglia (quale il recettore Fas) ed è sempre mascherata dagli effetti anti-apoptotici di NF- $\kappa$ B (che è contemporaneamente attivato). Comunque, TRADD lega FADD, che recluta la proteasi caspasi-8. Un'alta concentrazione di caspasi-8 induce la propria attivazione auto-proteolitica e il susseguente clivaggio di altre caspasi effettrici che inducono il processo apoptotico. I molti effetti, spesso conflittuali, mediati dalle vie del TNF- $\alpha$  sopracitate, indicano la presenza di un estensivo e complesso *cross-talk* di segnali biochimici. Se un agente batterico supera la cute i macrofagi che vi risiedono riconoscono le proteine di membrana (in particolare LPS) e producono immediatamente citochine solubili, tra cui TNF- $\alpha$ . Queste agiscono sulle cellule endoteliali che aumentano l'espressione, verso il lume del vaso, di E-selectina e P-selectina. Queste molecole reclutano dal sangue i neutrofili e i monociti circolanti, che si agganciano alla parete del vaso. Nel frattempo i macrofagi attivati e le cellule endoteliali producono chemochine che aumentano l'affinità di integrine. In questo modo l'integrina e il suo ligando si fissano e, finalmente, il leucocita può organizzarsi per il passaggio nel tessuto connettivo circostante il vaso.

- **TGF- $\beta$ 1**: membro della superfamiglia  $\beta$  delle citochine di trasformazione cellulare. È una proteina secreta che svolge molte funzioni cellulari, tra cui il controllo della crescita cellulare, della proliferazione cellulare, della differenziazione cellulare e dell'apoptosi. Nell'uomo, TGF- $\beta$ 1 è codificato dal gene TGFB1. TGF- $\beta$  agisce sinergicamente con TGF- $\alpha$  nella trasformazione cellulare. Funziona anche come un fattore di crescita autocrino negativo. La disregolazione dell'attivazione e della segnalazione di TGF- $\beta$  può causare l'apoptosi. Molte cellule sintetizzano TGF- $\beta$  e quasi tutte hanno recettori specifici per questo peptide. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 funzionano tutti attraverso gli stessi sistemi di segnalazione dei recettori. TGF- $\beta$ 1 è stato prima identificato nelle piastrine umane come proteina con una massa molecolare di 25 kDa con un ruolo potenziale nella guarigione delle ferite. TGF- $\beta$ 1 svolge un ruolo importante nel controllo del sistema immunitario e mostra diverse attività su diversi tipi di cellule o in differenti fasi di sviluppo. La maggior parte delle cellule immunitarie (o leucociti) secernono TGF- $\beta$ 1.

I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD). Le barre di errore rappresentano la deviazione standard e sono state indicate in ogni esperimento. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati sia il test del T di Student che l'ANOVA One-Way, considerando le differenze statisticamente significative con un p-value  $< 0.05$ . L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software GraphPad Prism.

## 9. RISULTATI

Sono state condizionate alcune linee primarie di LAC con supernatanti provenienti dalla coltura di LMSCs - area tissutale distante dal tumore, e di ADMSC derivanti da tessuto adiposo mediastinico - zona tissutale libera dal tumore, derivati da pazienti con tumore maligno del polmone (adenocarcinoma) o patologia benigna (amartocondroma, cisti bronchiali, polmoniti). Questi esperimenti sono stati condotti per verificare quale fosse l'azione in vitro del microambiente cellulare, generato da MSCs derivato da due diverse fonti tissutali (tessuto

polmonare e tessuto adiposo mediastinico), sulla vitalità delle cellule tumorali. Con questo studio abbiamo quindi considerato la distanza anatomica del sito del prelievo dal tumore e le caratteristiche di benignità o malignità. Per testare potenziali effetti biologici sulle LAC abbiamo deciso di tenere in considerazione le principali proprietà tumorigeniche umane, come la capacità proliferativa cellulare, la migrazione cellulare e la capacità clonogenica.

I risultati (Figura 2) hanno dimostrato che la vitalità delle LAC è significativamente aumentata al giorno 7 rispetto al controllo quando le cellule vengono coltivate con supernatanti di entrambi i tessuti (LMSCs o ADMSCs) derivanti da pazienti affetti da tumore maligno ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ ). Diversamente, il risultato della vitalità delle LAC è risultato significativamente diminuito al giorno 5 e 7 rispetto al controllo (tutti  $p < 0,001$ ) quando le cellule sono coltivate con supernatanti di LMSCs e al giorno 3, 5 e 7 (tutti  $p < 0,001$ ) se condizionati con supernatanti di ADMSCs derivati da pazienti affetti da patologie benigne (Figura 2B).

Sulla base del primo saggio, anche il secondo, il migration assay, mostra come MD-ADMSC cSPNs e MD-LMSC cSPNs facciano migrare le A549 rispetto al controllo. Questa caratteristica tipicamente associata alle patologie maligne, risulta però non essere statisticamente significativa nel caso di BD-ADMSC cSPNs e BD-LMSC cSPNs rispetto al controllo. La validità del saggio è stata dimostrata con la positività all'SDF-1 (Figura 3).

Per verificare se la capacità clonogenica delle cellule LAC potesse essere influenzata dagli stessi mezzi condizionati derivanti da MSC cSPNs, sono stati eseguiti saggi clonogenici sulle cellule LAC. I risultati (Figura 4A) hanno rivelato che i supernatanti derivanti da ADMSC di pazienti affetti da neoplasia maligna sono in grado di aumentare significativamente il numero di cloni formati dalle cellule LAC rispetto al controllo ( $p < 0.05$ ), anche i supernatanti derivati da LMSCs di pazienti con carcinoma maligno influenzano il numero di cloni rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ). Viceversa, non sono state osservate variazioni significative per quanto riguarda il

numero di cloni quando le cellule LAC vengono coltivate in presenza di supernatanti derivati da LMSCs o ADMSCs di pazienti affetti da patologia benigna (Figura 4B).

In seguito, ci siamo chiesti se l'effetto potesse essere correlato al tipo di cellule neoplastiche e all'azione del microambiente toracico, quindi abbiamo testato gli stessi mezzi condizionati su una neoplasia non di origine polmonare, la linea cellulare T24 del carcinoma vescicale umano. Per convalidare il saggio, la linea di cellule epiteliali A549 è stata usata come controllo. I risultati hanno dimostrato che la vitalità delle cellule T24 segue la stessa tendenza osservata quando i supernatanti sono stati testati sulle LAC, per quanto riguarda i supernatanti derivanti sia da LMSCs sia da ADMSCs di pazienti affetti da patologia benigna (Figura 4 B,  $p < 0.001$  in entrambi i giorni 5 e 7), la crescita delle cellule T24 è significativamente aumentata al giorno 5 e 7 solo in presenza di campioni condizionati derivanti da LMSC da pazienti affetti da neoplasia maligna (Figura 5A,  $p < 0,001$ , sia nei giorni 5 che 7). I risultati con le A549 mostrano una tendenza simile a quelli osservati nelle cellule primarie LAC (Figura 2 A-B) con supernatanti LMSCs e ADMSCs derivati da pazienti con neoplasia maligna e patologia benigna (Figura 5 C-D).

Inoltre, per quanto riguarda la capacità clonogenica, non è stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa tra il numero di cloni generati dalle cellule T24 e A549 con tutti i supernatanti (tessuto polmonare o adiposo mediastinico, Figura 6, tutti  $p < 0,05$ ).

Dato che il nostro progetto sperimentale è stato eseguito in condizioni eterologhe usando supernatanti di MSCs e LAC di diversi pazienti, ci siamo chiesti se, in pazienti affetti da patologia maligna, effetti simili potessero essere presenti anche in un sistema autologo e se ci fosse un'azione specifica delle MSCs. Abbiamo quindi testato il supernatante proveniente da coltura di fibroblasti polmonari (MD-LFIBRO cSPNs) sulle A549 evidenziando una diminuzione significativa di proliferazione sia al giorno 5 ( $p < 0.05$ ) sia al giorno 7 ( $p < 0.0001$ ) rispetto al controllo. La mancanza di stimolo proliferativo è stata confermata dalla diminuzione

significativa dell'abilità a formare cloni delle A549 quando condizionate con MD-LFIBRO cSPNs (Figura 7 A- B). In condizioni maligne, effetti simili possano essere presenti anche in un sistema autologo analizzando le cellule LAC e i supernatanti di LMSCs e ADMSCs dello stesso paziente. I risultati hanno dimostrato che il supernatante derivato da LMSCs è in grado di aumentare significativamente la vitalità delle LAC (Figura 8,  $p < 0,001$  al giorno 3, 5, 7).

Infine, abbiamo analizzato se l'effetto biologico osservato in risposta ai campioni condizionati derivanti da MSCs potesse essere attribuibile ad un insieme di fattori solubili rilasciati, facendo uno screening di tutti i campioni condizionati con un pannello di 80 citocine pro- ed anti-infiammatorie e fattori di crescita noti per essere coinvolti nello sviluppo e nella modulazione del microambiente tumorale. I risultati hanno mostrato che i campioni condizionati ottenuti da LMSCs e ADMSCs derivate da pazienti affetti da patologie maligne esprimono un profilo di fattori solubili simili, ma anche uno specifico set che include GCP-2, GRO, IL-6, VEGF e IL-8 rilevando una sostanziale differenza tra i due pool di MSCs (Figura 9 A, tutte  $p < 0,05$ ). Diversamente, i supernatanti derivati da MSCs di pazienti affetti da patologia benigna mostrano un profilo proteico di citochine più variegato, mostrando un primo set comprendente TNF $\alpha$ , Light, GCP2, TIMP2, VEGF, Osteoprotegerina, MCP1, IL6 e GRO specificamente prodotte in supernatanti derivanti da ADMSCs ( $p < 0,05$ ) e un secondo set comprendente IGFBP2, IL16, IL10, TFG $\beta$ -2, RANTES, MIP-1 $\beta$ , NAP2 e IL8 specificatamente prodotte nei supernatanti derivati da LMSCs ( $p < 0,05$ ) (Figura 9B).

Abbiamo poi voluto valutare se vi fosse un'azione di "pre-condizionamento" che potesse essere attribuibile alla vicinanza tra cellule ADMSCa di paziente affetto da patologia benigna e una coltura primaria di LAC. Le BD-ADMSCs sono state messe in coltura per un mese con SPN provenienti da coltura di cellule tumorali primarie LAC. Successivamente è stato rimosso SPN derivato da quest'ultima coltura ed è stato rimpiazzato con terreno coltura basale per 7 giorni. Il SPN pre-condizionato (proveniente da coltura originaria di BD-ADMSCs condizionata) è di

nuovo stato testato sulla coltura primaria di cellule tumorali da ADC. Quest'ultima coltura ha mostrato un aumento al limite della significatività statistica ( $p < 0.05$ ) della proliferazione cellulare. (Figura 10)

Abbiamo poi valutato la produzione di *reactive oxygen species* (ROS) su colture di ADMSC provenienti dal tessuto adiposo mediastinico e dal tessuto adiposo della parete toracica di pazienti affetti da patologia benigna e maligna, sia con aggiunta di terreno di coltura lisato piastrinico (PL) che con FBS. Abbiamo rilevato un aumento statisticamente significativo ( $p = 0.047$ ) della produzione di ROS nelle colture di ADMSC provenienti dal tessuto adiposo mediastinico di pazienti affetti da patologia maligna sia con aggiunta di PL che di FBS rispetto alla quantità di ROS rilevata nelle colture di ADMSC provenienti da pazienti affetti da patologia benigna. (Figura 11)

Sulla base dei suddetti saggi, sono state svolte analisi di RT-qPCR. La prima (Figura 12) mostra come in cellule di A549 siano statisticamente aumentate B23 in caso di forte stress cellulare ( $p < 0,001$ ) e IL-6 in A549 coltivate con siero ( $p < 0,001$ ); in caso di deprivazione da siero aumentano anche IL-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ), TNF $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) e Egr-1 ( $p < 0,05$ ). La seconda (Figura 13) è stata fatta sugli esosomi isolati dalla stessa linea cellulare e mostra come in condizioni favorevoli B23, IL-6, IL-8, Vimentin, N-cadherin, TGF-1 $\beta$ , Snail1 e TNF $\alpha$  siano aumentati rispetto al 18s in maniera statisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

## 10. DISCUSSIONE

Recentemente le MSCs sono state considerate candidate ideali per molteplici applicazioni cliniche e terapeutiche, quasi concludendo che la loro ampia applicabilità sia anche possibile nel trattamento delle patologie tumorali. Le MSCs hanno rivelato uno specifico tropismo e un'attività immunostimolante contro le cellule tumorali, quindi sarebbe possibile concepire terapie oncologiche attraverso il loro utilizzo. Tuttavia, la questione spinosa è se l'uso clinico di

MSCs possa recare realmente un beneficio nella cura della patologia neoplastica o se piuttosto consenta maggiormente lo sviluppo di cellule tumorali. Inoltre, potendo le MSCs derivare da diverse fonti cellulari, è ancora poco chiaro se esista una fonte tissutale che favorisca maggiormente la progressione tumorale.

I nostri risultati confermano la consapevolezza che le caratteristiche biologiche delle cellule tumorali, quali la benignità e la malignità, siano in grado di generare differenti microambienti in vitro diminuendo o favorendo, rispettivamente, la crescita tumorale e la sua capacità clonogenica. Potremmo supporre infatti che gli effetti nel microambiente di patologie benigne e maligne non si limiterebbe alle nicchie locali associate al tumore, ma potenzialmente porterebbe allo sviluppo di un macroambiente sistemico, influenzando così il pool di MSCs anche a nicchie distanti come quelle mediastiniche. Infatti, i nostri risultati mostrano che i supernatanti derivati da LMSCs e ADMSCs riproducono effetti simili nello stesso scenario benigno o maligno, dove il comportamento biologico delle cellule LAC non sembra essere influenzato né dal tipo di pool mesenchimale (polmone vs tessuto adiposo mediastinico) né dalla distanza anatomica del tumore (zona tissutale locale o remota).

Inoltre, data la capacità di tutti i mezzi condizionati di riprodurre o sostenere gli effetti di crescita (la capacità clonogenica di T24 è inalterata) su un tipo di tumore non polmonare come il carcinoma della vescica umana, presumiamo che l'azione paracrina avvenga in maniera indipendente dal tipo tumorale.

Ancora più importante, anche in condizioni autologhe, possiamo osservare effetti simili, escludendo la possibilità che il miglioramento o la diminuzione della vitalità delle cellule neoplastiche sia dovuto solo ad una reattività maggiore dei supernatanti. Inoltre, come effetto sistemico in un ambiente maligno come quello riprodotto nel tumore del polmone autologo, risulta aumentato lo stimolo del supernatante derivante da LMSCs rispetto a quello di ADMSCs. Questa leggera differenza biologica tra l'insieme eterologo e autologo potrebbe essere attribuita

ad una capacità delle cellule tumorali di consentire la propria progressione all'interno del proprio microambiente (polmone), rispetto all'azione invece a distanza a livello del tessuto adiposo mediastinico. Questi risultati spiegano quindi in parte il ruolo del microambiente che sia inibisce sia promuove la neoplasia.

Sebbene siano stati eseguiti esperimenti su pazienti ai primi stadi (T1 N0 M0) dove non sono state riscontrate metastasi, non possiamo escludere che l'effetto sistemico possa essere dovuto ad un aumento del numero di cellule simil-mesenchimali nel sangue periferico, influenzando così il pattern di fattori solubili delle popolazioni MSC in siti lontani.

Questo studio dimostra che i fattori solubili paracrini derivanti da MSCs sono in vitro permissivi con le cellule tumorali maligne indipendentemente dal loro tessuto di origine, mentre esercitano azioni inibitorie se derivano da pazienti affetti da patologie benigne. Questo spiegherebbe in modo biologico il duplice ruolo delle MSCs nella promozione o inibizione della crescita e della progressione del tumore in linea con le osservazioni precedenti. In altre parole, il comportamento benigno o maligno di un pool di MSCs sarebbe consentito dal contesto tumorale e non intrinsecamente dalle MSCs stesse.

Gli effetti sistemici indotti dal tumore nei confronti di MSCs dipendono da un duplice meccanismo, alcuni sono associati al rilascio di numerosi fattori di crescita e citochine nel sangue da parte di cellule tumorali in grado di migliorare la migrazione e la capacità di homing delle MSCs, altre sono associate al conseguente aumento delle molecole di adesione come VCAM-1 responsabili dell'interazione cellulare avanzata tra cellule endoteliali e MSCs e l'accumulo di questi ultimi nel sito tumorale.

Tumori solidi come l'adenocarcinoma possono includere una frazione stromale, che normalmente deriva dal reclutamento e dall'homing di MSCs da entrambe le nicchie locali e remote. Di conseguenza, le MSCs possono rappresentare una componente dello stroma tumorale adatto al mantenimento dell'architettura tumorale e alla co-evoluzione della frazione di MSCs



all'interno del microambiente tumorale in combinazione con le cellule tumorali. Ad oggi è chiaro che l'homing di MSCs da nicchie sistemiche (precedentemente descritte dal solo midollo osseo attraverso il gradiente chemotattico esercitato da numerose citochine infiammatorie e fattori di crescita come SDF-1, VEGF, HGF, IL-6 o MCP-1), può anche verificarsi da siti diversi dal midollo osseo, come il tessuto adiposo.

I nostri risultati sono in linea con quelli della letteratura, ma suggeriscono anche che meccanismi diversi da quelli correlati alle citochine potrebbero controllare l'effetto paracrino MSC-mediato; confermando che i tumori maligni abbiano maggiori probabilità di avere effetti sistemici rispetto alle neoplasie benigne.

La profonda comprensione del comportamento biologico delle MSCs all'interno del microambiente e del macroambiente tumorale rappresenta il punto di partenza per poter testare clinicamente qualsiasi applicazione di terapia cellulare per il trattamento del tumore del polmone.

L'analisi delle citochine ha rivelato che non esiste un profilo specifico espresso nei microambienti di pazienti affetti da patologie benigne o maligne. Considerando che il significato biologico delle caratteristiche benigne e maligne di un tumore non può essere definito esclusivamente sulla base delle citochine o dei fattori di crescita prodotte da colture in vitro, i risultati suggeriscono che le MSCs derivanti da tessuto polmonare o adiposo, sono in grado di secernere profili simili e che le cellule LAC potrebbero comportarsi in modo diverso a seconda dell'azione paracrina mediata da MSCs probabilmente sulla base di proprie caratteristiche peculiari tipiche di ciascuna specifica della popolazione di cellule tumorali.

L'analisi delle A549 in PCR ha confermato i risultati precedenti dimostrando che numerose citochine presenti nel supernatante le ritroviamo anche all'interno delle cellule stesse, in particolar modo VEGF, IL-6 e IL-8. La PCR degli esosomi ha dimostrato, come da numerosi

studi, la presenza di proteine, interleuchine e fattori di crescita essenziali per la tumorigenicità (EMT, angiogenesi, proliferazione).

Tabella 1.

Paziente n°	Età	Fumo	Comorbidità	Intervento	Istologia	C H T ad j	Follow- up
42	78	ex da 33aa, 40 s/d per 30aa	RGE	Resezione atipica LSD	Amartocondroma	-	NED
32	72	ex dal 2012, 30 s/d per 50aa	IA	Resezione atipica LSD	ADC G2 pT1a non mutato	si	DOD dopo 30m
35	68	ex da 20 aa. 3-4-s/d per 35 aa	IA	Lobectomia LSS	ADC G2 pT1b, pN0 stadio IA EGFR + Esone 21	si	NED
28	53	nega	IA	Resezione atipica LSD	Amartocondroma	-	NED
44	53	15 s/d	-	Resezione	Amartocondroma	-	NED

		per 20 aa		atipica LSS			
5	73	ex da 50aa	-	Resezione atipica LSS	Amartocondroma	-	NED
38	61	20 s/d da 45aa	Dislipidemia	Lobectomia LSD	ADC  G3  pT1a, pN0 stadio IA  non mutato	si	AWD
39	73	nega	-	Lobectomia LSS	ADC  G1  pT1b, pN0 stadio IA  EGFR + Esone 19	No	NED
56	54	ex da 20 aa. 15 s/d per 15 aa	IA	Resezione atipica LIS	Amartocondroma	-	NED
55	50	nega	RGE	Lobectomia LSD	ADC  G2  pT1b, pN0 stadio IA	-	NED

## 10. ICONOGRAFIA

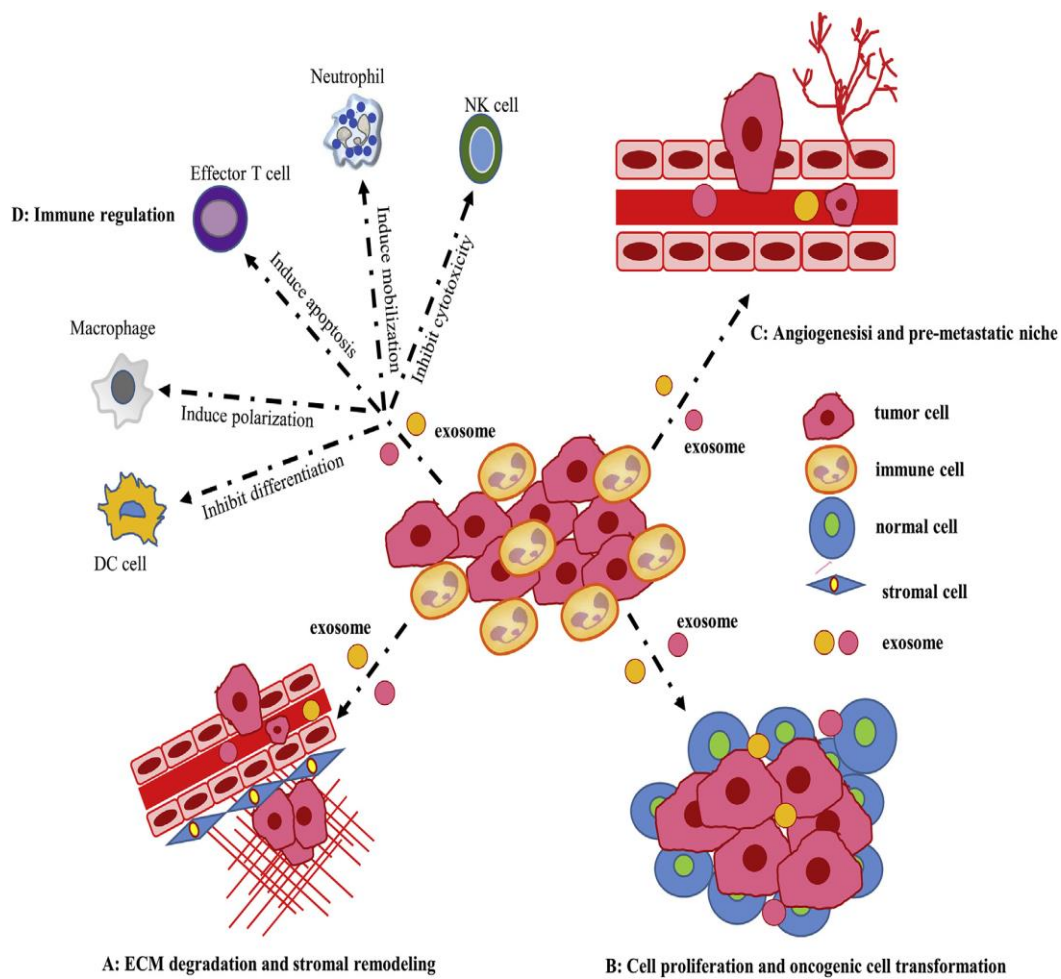
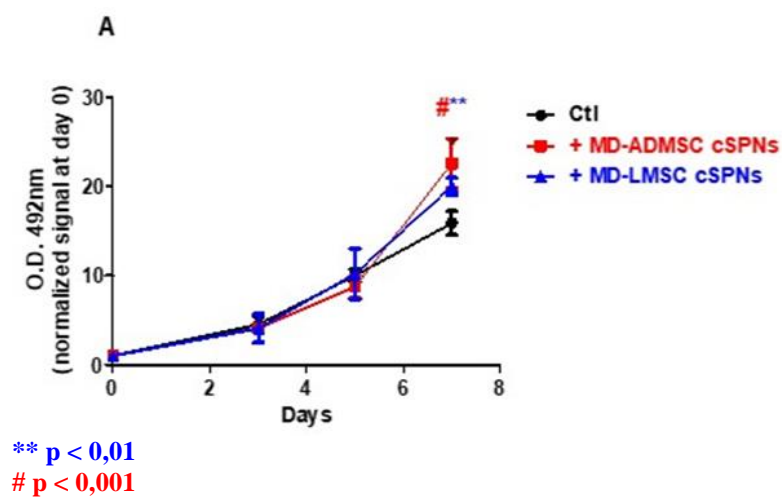
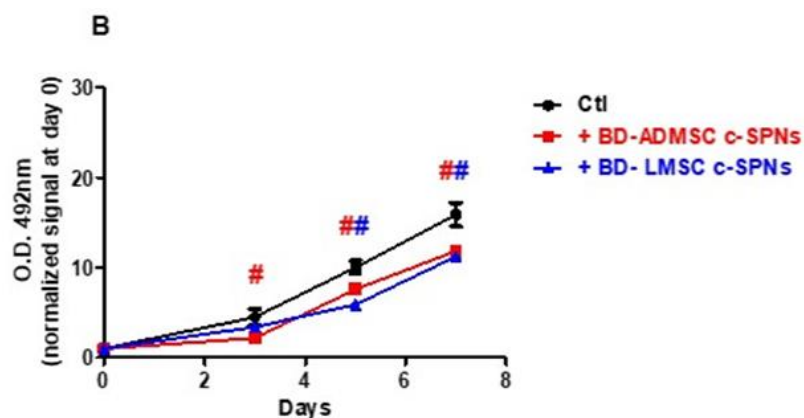


Figura 1: ruolo degli esosomi nella carcinogenesi polmonare (Zhou L. *et al.*, 2017)





#  $p < 0,001$

#  $p < 0,001$

**Ctl**= Control

**MD-ADMSC** and **MD-LMSC cSPNs**= ADMSC or LMSC-derived supernatants obtained from patients with NSCLC

**BD-ADMSC** and **BD-LMSC cSPNs**= ADMSC or LMSC-derived supernatants obtained from patients with benign diseases

Figura 2 AB: Saggio di proliferazione delle LAC

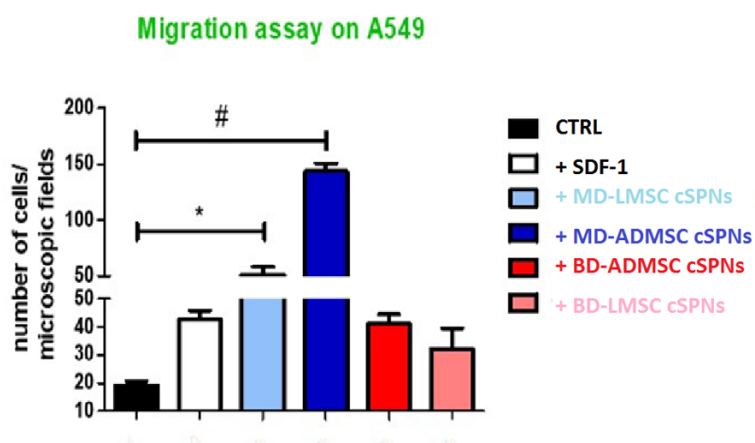


Figura 3: saggio di migrazione su cellule di A549

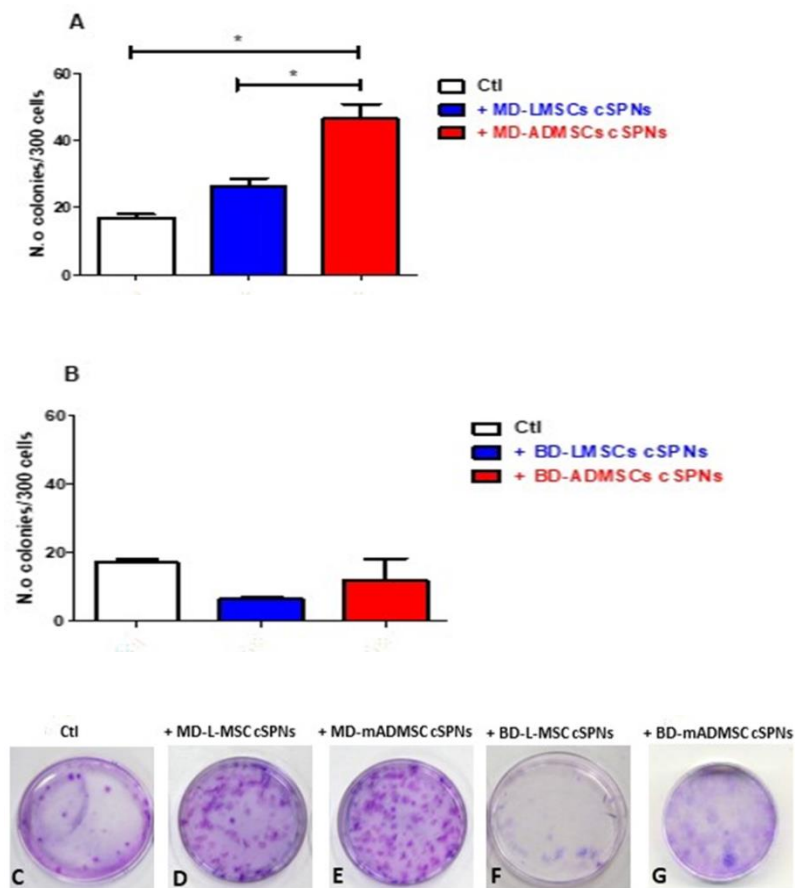


Figura 4 A – G: saggio clonogenico effettuato sulle LAC

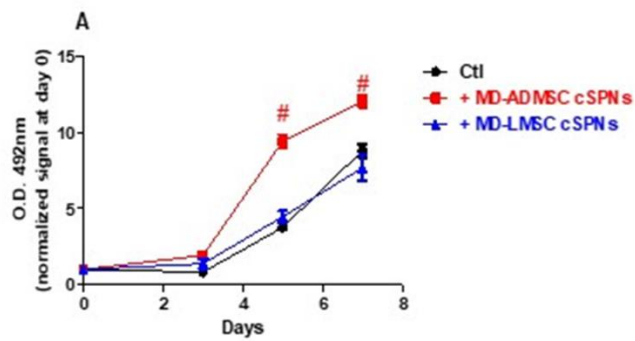


Figura 5A: MTS assay nella T24 cell line condizionate con supernatanti provenienti da pazienti affetti da tumore maligno

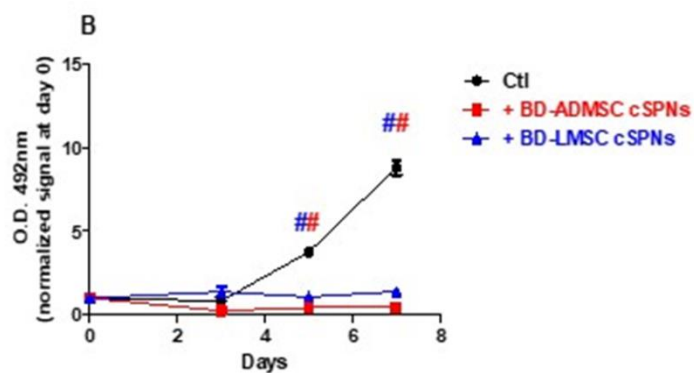


Figura 5 B: MTS assay nella T24 cell line condizionate con supernatanti provenienti da pazienti affetti da patologie benigne

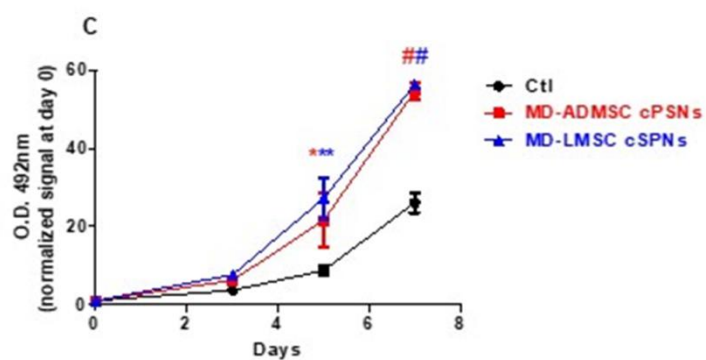


Figura 5 C: MTS assay nella A549 cell line

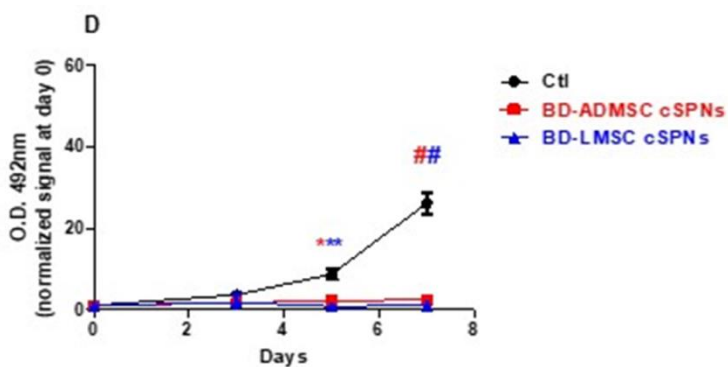


Figura 5 D: MTS assay nella A549 cell line

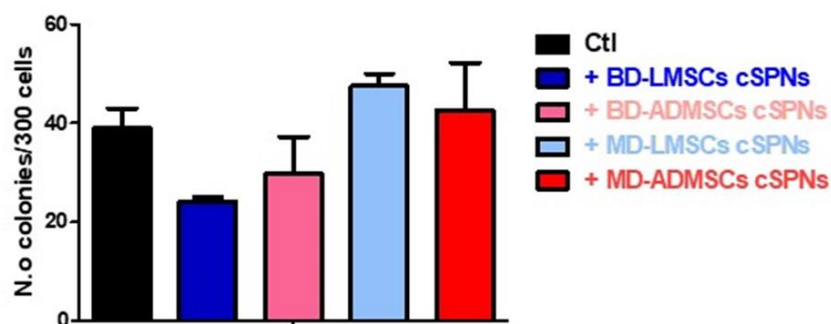


Figura 6: saggio clonogenico effettuato sulle T24

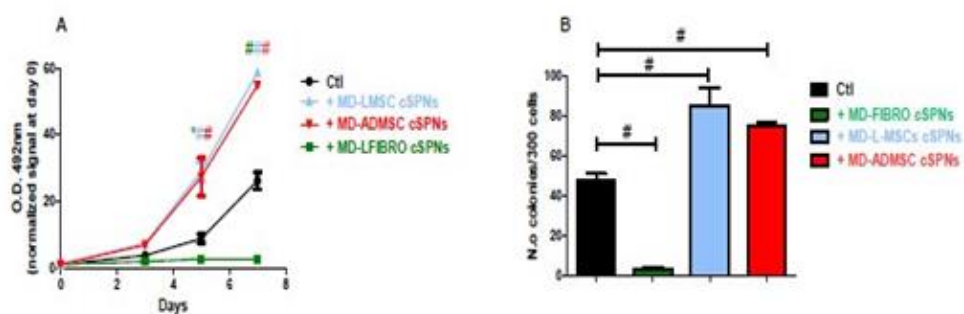


Figure 5A-B.

Ctl= Control

MD-ADMSC, MD-LMSC cSPNs and MD-FIBRO= ADMSC, LMSC and lung fibroblast-derived supernatants obtained from the same patient with NSCLC

\*  $p < 0.005$  #  $p < 0.001$

$p < 0.001$

Figura 7 A-B: Valutazione affetto specifico delle MSCs.



# adenocarcinoma 1 and autologous malignant MSCs

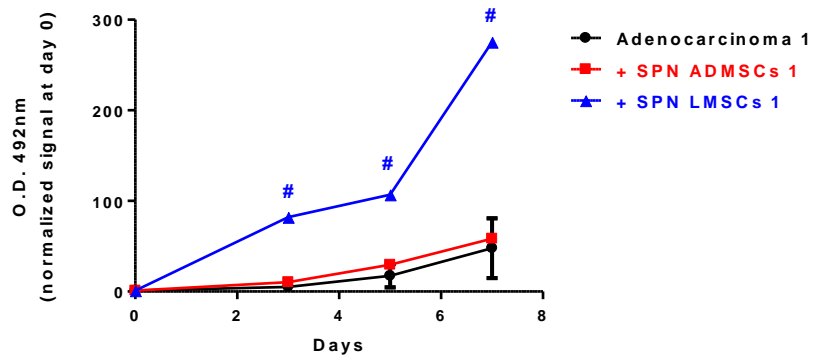


Figura 8: Valutazione comportamento LAC con SPNs autologhi

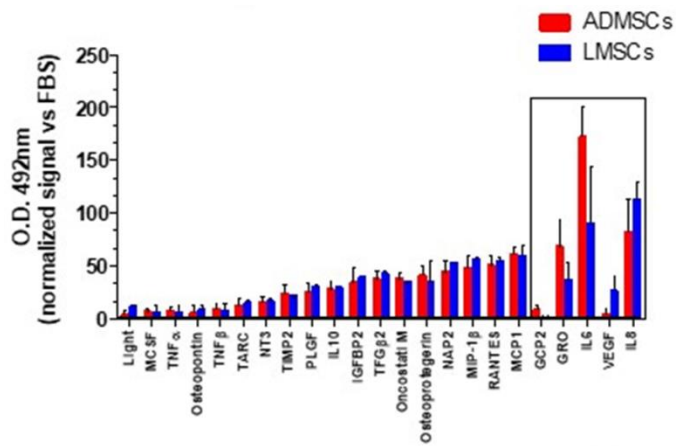


Figura 9 A: cytokine profile assay eseguito su MD-MSCs cSPNs

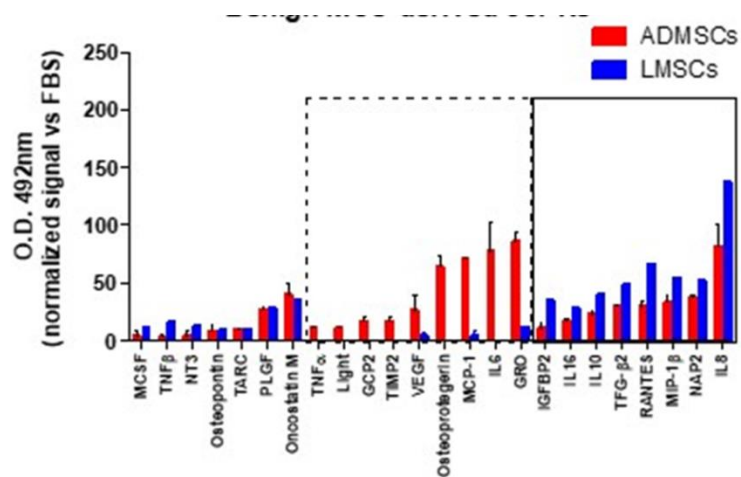


Figura 9B: cytokine profile assay eseguito su BD-MSCs cSPNs

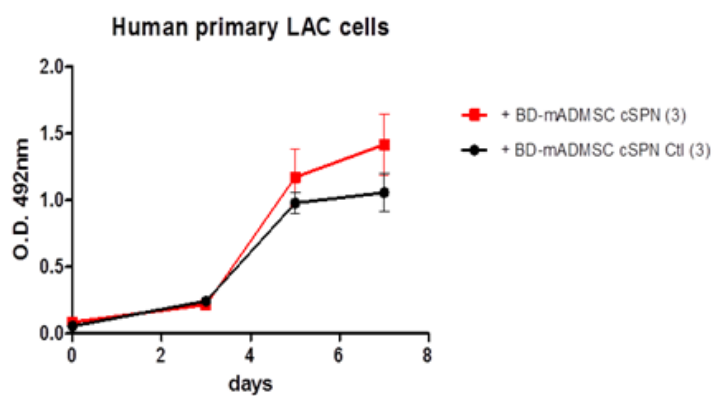


Figura 10: LAC condizionate con SPN “pre-condizionato” di BD-ADMSCs

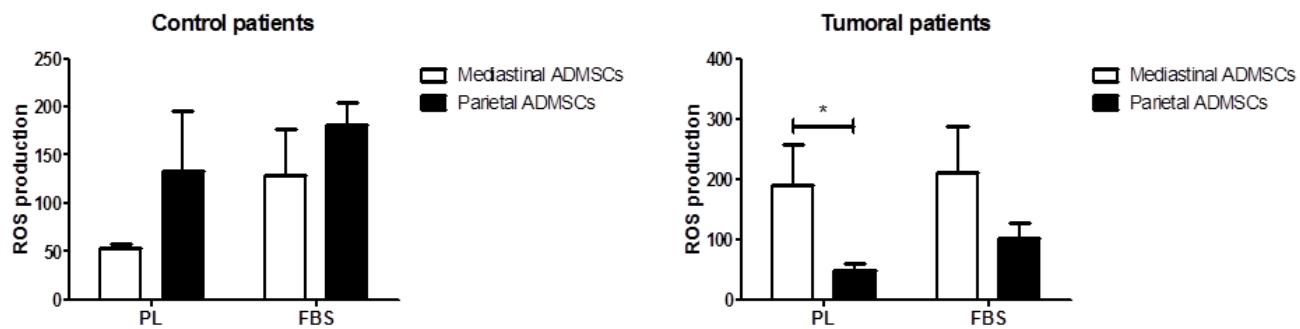


Figura 11: Valutazione ROS su ADMSCs mediastiniche e di parete toracica in pazienti affetti da patologia benigna e maligna con aggiunta di PL e FBS

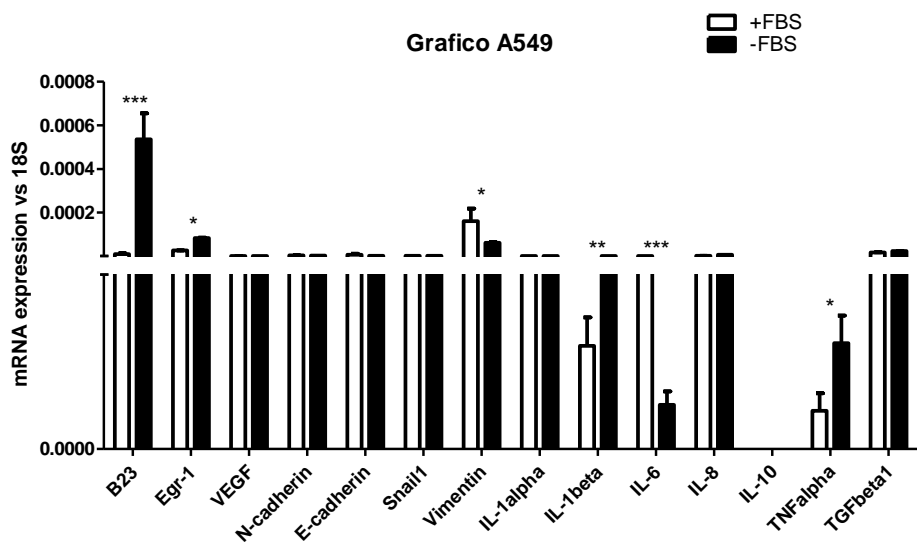


Figura 12: Analisi RT-qPCR delle A549

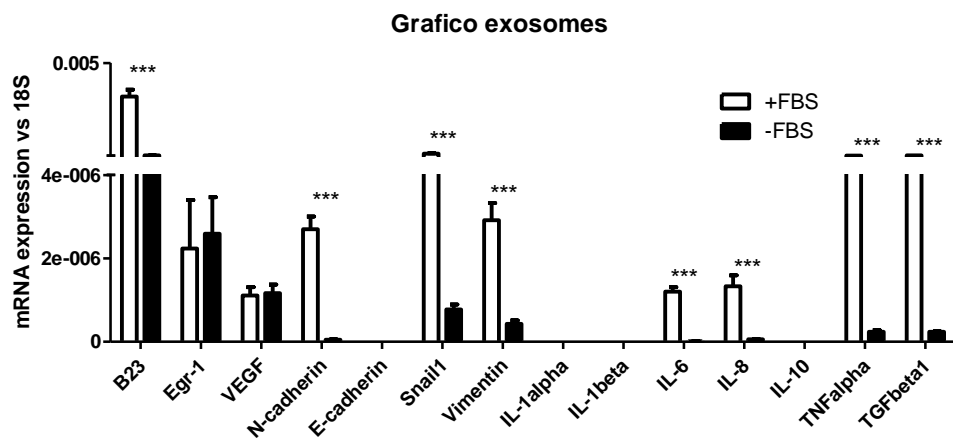


Figura 13: Analisi RT-qPCR degli esosomi isolati da A549

## 12. BIBLIOGRAFIA

- 
- <sup>1</sup> Liu R, Wei S, Chen J, Xu S. Liu Mesenchymal stem cells in lung cancer tumor microenvironment: their biological properties, influence on tumor growth and therapeutic implications. 2014. *Cancer Letters* 353:145–152.
- <sup>2</sup> G.J. Block, S. Ohkouchi, F. Fung, J. Frenkel, C. Gregory, R. Pochampally, et al., Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. 2009. *Stem Cells* 27: 670–681
- <sup>3</sup> MH Xu, X Gao, D Luo, XD Zhou, W Xiong, GX Liu, EMT and acquisition of stem cell-like properties are involved in spontaneous formation of tumorigenic hybrids between lung cancer and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. 2014. *PLoS ONE* 9:e87893.
- <sup>4</sup> C Choe, YS Shin, SH Kim, MJ Jeon, SJ Choi, J Lee, et al., Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance motility of non-small cell lung cancer cells through the hedgehog signaling pathway. 2013. *Anticancer Res.* 33:3715–3723
- <sup>5</sup> M Konopleva, S Konoplev, W Hu, AY Zaritskey, BV Afanasiev, M Andreeff, Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. 2002. *Leukemia* 16:1713-1724.
- <sup>6</sup> Collas P. Programming differentiation potential in mesenchymal stem cells. 2010. *Epigenetics.* 16;5(6):476-82
- <sup>7</sup> Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. 2008. *Gene Ther* 15:730-8
- <sup>8</sup> Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. 2004. *J Natl Cancer Inst.* 96:1593-603
- <sup>9</sup> Cioffo BG, Karnaoub AE. Mesenchymal stem cells in tumor development. Emerging role and concepts. 2012. *Cell adhesion & Migration* 6:3, 220-230
- <sup>10</sup> Gao Z, Zhang L, Hu J, Sun Y. Mesenchymal stem cells: a potential targeted-delivery vehicle for anti-cancer drug, loaded nanoparticles. 2013 *Nanomedicine* 9(2):174-84
- <sup>11</sup> Bian YZ, Li G, Gan YK, Hao YQ, Xu WT, Tang TT. Increased number of mesenchymal stem cell-like cells in peripheral blood of patients with bone sarcomas. 2009. *Archives of Med. Res.* 40:163-168
- <sup>12</sup> V.B. Fernandez Vallone, E.L. Hofer, H. Choi, R.H. Bordenave, E. Batagelj, L. Feldman, et al., Behaviour of mesenchymal stem cells from bone marrow of untreated advanced breast and lung cancer patients without bone osteolytic metastasis. 2013. *Clin. Exp. Metastasis* 30:317-332
- <sup>13</sup> Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. 2008. *Genes & Develop.* 22:559-574

- 
- <sup>14</sup> Jemal A, Murray T, Ward E, et al: Cancer statistics, 2005. CA. Cancer J Clin 2005; 55:10-30
- <sup>15</sup> Krupnick AS, Kreisel D, Hope A et al. Recent advances and future perspectives in the management of lung cancer. Curr Probl Surg 2005; 42: 540-610
- <sup>16</sup> Naruke T, et al: Prognosis and survival in resected lung cancer based on the new international staging system. J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 96:440
- <sup>17</sup> Aster RKA. Le basi patologiche delle malattie. Edra - Masson Vol. 2. 2010
- <sup>18</sup> Lanzoni G, Oikawa T, Wang Y, Cui CB, Carpino G, Cardinale V, Gerber D, Gabriel M, Dominguez-Bendala J, Furth ME, Gaudio E, Alvaro D, Inverardi L, Reid LM. Concise review: clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas. Stem Cells. 2013 Oct;31(10):2047-60. doi: 10.1002/stem.1457. Review.
- <sup>19</sup> Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol. 1999 Nov;107(2):275-81
- <sup>20</sup> Friedenstein AJ, Il'ia Piatetzky-Shapiro and KV Petrakova. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 16:381-90
- <sup>21</sup> Caplan AI. (1991). Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 9:641-50
- <sup>22</sup> Acker JP, JA Elliott and LE McGann. (2001). Intercellular ice propagation: experimental evidence for ice growth through membrane pores. Biophys J 81:1389-97
- <sup>23</sup> Alessandrino P, P Bernasconi, D Caldera, A Colombo, M Bonfichi, L Malcovati, C Klersy, G Martinelli, M Maiocchi, G Pagnucco, M Varettoni, C Perotti and C Bernasconi. (1999)
- <sup>24</sup> Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. Bone Marrow Transplant 23:533-7
- <sup>25</sup> Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr 2;284(5411):143-7. PubMed PMID: 10102814
- <sup>26</sup> Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7
- <sup>27</sup> Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Apr;36(4):568-84. Review
- <sup>28</sup> Vogel W, F Grünebach, CA Messam, L Kanz, W Brugger and HJ Bühring. (2003). Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. Haematologica 88:126-33

- 
- <sup>29</sup> Campioni D, F Lanza, S Moretti, M Dominici, M Punturieri, S Pauli, T Hofmann, E Horwitz and GL Castoldi. (2003). Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105(+) and fibroblast(+) stromal cells from AML: implications for their plasticity along endothelial lineage. *Cytotherapy* 5:66-79
- <sup>30</sup> Majumdar MK, M Keane-Moore, D Buyaner, WB Hardy, MA Moorman, KR McIntosh and JD Mosca. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 10:228- 41. 21. González-Cruz RD, VC Fonseca and EM Darling. (2012)
- <sup>31</sup> Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10):2648-59. Epub 2007 Jul 5
- <sup>32</sup> Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen*. 2007b Sep-Oct;15 Suppl 1:S18-26. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00221.x. Review
- <sup>33</sup> Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986 Dec 25;315(26):1650-9. Review
- <sup>34</sup> Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):304-10. Epub 2006 Dec 14
- <sup>35</sup> Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. 2008 May;15(10):711-5. doi: 10.1038/gt.2008.35. Epub 2008 Mar 20. Review
- <sup>36</sup> Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. Review
- <sup>37</sup> Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*. 2008 Dec;130(6):1091-103. doi: 10.1007/s00418-008-0530-8. Epub 2008 Nov 6. Review
- <sup>38</sup> Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 2007 Feb;7(2):139-47. Review
- <sup>39</sup> Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:119-50. Review
- <sup>40</sup> Hall B, Andreeff M, Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(180):263-83. Review
- <sup>41</sup> Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*. 2009;4(4):e4992. doi: 10.1371/journal.pone.0004992. Epub 2009 Apr 7

- 
- <sup>42</sup> Son BR, LA Marquez-Curtis, M Kucia, M Wysoczynski, AR Turner, J Ratajczak, MZ Ratajczak and A Janowska-Wieczorek. (2006). Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 24:1254-64
- <sup>43</sup> Caplan AI and JE Dennis. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98:1076-84
- <sup>44</sup> Bernardo ME and WE Fibbe. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 13:392-402
- <sup>45</sup> Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138. Review
- <sup>46</sup> Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, Panaro MA, Mitolo V, Freyssinet JM, Kunzelmann C. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1 CX3CR1 axis. *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):785-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08 1946. Epub 2009 Jan 20
- <sup>47</sup> Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Apr;40:72-81. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.009. Epub 2015 Feb 25. Review
- <sup>48</sup> Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9
- <sup>49</sup> Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 6;107(14):6328-33. doi: 10.1073/pnas.0914843107
- <sup>50</sup> Fontana S, Saieva L, Taverna S, Alessandro R. Contribution of proteomics to understanding the role of tumor-derived exosomes in cancer progression: state of the art and new perspectives. *Proteomics.* 2013 May;13(10-11):1581-94. doi: 10.1002/pmic.201200398. Epub 2013 Mar 22. Review
- <sup>51</sup> Xin H, Y Li and M Chopp. (2014). Exosomes/miRNAs as mediating cellbased therapy of stroke. *Front Cell Neurosci* 8:377
- <sup>52</sup> González-Cruz RD, VC Fonseca and EM Darling. (2012). Cellular mechanical properties reflect the differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E1523-9
- <sup>53</sup> De Ugarte DA, K Morizono, A Elbarbary, Z Alfonso, PA Zuk, M Zhu, JL Dragoo, P Ashjian, B Thomas, P Benhaim, I Chen, J Fraser and MH Hedrick. (2003). Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174:101-9
- <sup>54</sup> Aust L, B Devlin, SJ Foster, YD Halvorsen, K Hicok, T du Laney, A Sen, GD Willingmyre and JM Gimble. (2004). Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 6:7-14



- 
- <sup>55</sup> Mitchell JB, K McIntosh, S Zvonic, S Garrett, ZE Floyd, A Kloster, Y Di Halvorsen, RW Storms, B Goh, G Kilroy, X Wu and JM Gimble. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24:376-85
- <sup>56</sup> Toyoda M, Y Matsubara, K Lin, K Sugimachi and M Furue. (2009). Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues. *Cell Biochem Funct* 27:440-7
- <sup>57</sup> Russo V, C Yu, P Belliveau, A Hamilton and LE Flynn. (2014). Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications. *Stem Cells Transl Med* 3:206-17
- <sup>58</sup> Schweizer R, W Tsuji, VS Gorantla, KG Marra, JP Rubin and JA Plock. (2015). The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem Cells Int* 2015:120949
- <sup>59</sup> Després JP. (2006). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 38:52-63
- <sup>60</sup> Lim S and JB Meigs. (2013). Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk. *Int J Cardiol* 169:166-76
- <sup>61</sup> Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54. Review.
- <sup>62</sup> Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest*. 2016 Apr 1;126(4):1208-15. doi: 10.1172/JCI81135. Epub 2016 Apr 1. Review.
- <sup>63</sup> Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010 Oct;101(10):2087-92. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x. Epub 2010 Jul 7. Review.
- <sup>64</sup> Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Apr;40:72-81. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.009. Epub 2015 Feb 25. Review.
- <sup>65</sup> Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654-9
- <sup>66</sup> Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 6;107(14):6328-33. doi: 10.1073/pnas.0914843107
- <sup>67</sup> Fontana S, Saieva L, Taverna S, Alessandro R. Contribution of proteomics to understanding the role of tumor-derived exosomes in cancer progression: state of the art and new perspectives. *Proteomics*. 2013 May;13(10-11):1581-94. doi: 10.1002/pmic.201200398. Epub 2013 Mar 22. Review

- 
- <sup>68</sup> Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol.* 1985 Sep;101(3):942-8
- <sup>69</sup> Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326. Epub 2014 Aug 21. Review
- <sup>70</sup> Christ L, Raiborg C, Wenzel EM, Campsteijn C, Stenmark H. Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem Sci.* 2017 Jan;42(1):42-56. doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.016. Epub 2016 Sep 23. Review
- <sup>71</sup> van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, Marks MS, Rubinstein E, Raposo G. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and - dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell.* 2011 Oct 18;21(4):708-21
- <sup>72</sup> Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic.* 2011 Dec;12(12):1659-68. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x. Epub 2011 Jun 30. Review
- <sup>73</sup> Li W, Hu Y, Jiang T, Han Y, Han G, Chen J, Li X. Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64. *APMIS.* 2014 Nov;122(11):1080-7
- <sup>74</sup> Sinha S, Hoshino D, Hong NH, Kirkbride KC, Grega-Larson NE, Seiki M, Tyska MJ, Weaver AM. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J Cell Biol.* 2016 Jul 18;214(2):197-213
- <sup>75</sup> Ruiz-Martinez M, Navarro A, Marrades RM, Viñolas N, Santasusagna S, Muñoz C, Ramírez J, Molins L, Monzo M. YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 9;7(32):51515-51524
- <sup>76</sup> Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, Zhang J, Weitz J, Chin L, Futreal A, Kalluri R. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem.* 2014 Feb 14;289(7):3869-75
- <sup>77</sup> Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int J Mol Sci.* 2013 Jul 9;14(7):14240-69. doi: 10.3390/ijms140714240. Review.
- <sup>78</sup> Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol.* 2015 Jul 10;8:83. doi: 10.1186/s13045-015-0181-x. Review.
- <sup>79</sup> Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2014 Aug;29:116-25. doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004. Epub 2014 Jun 22. Review
- <sup>80</sup> Huang SH, Li Y, Zhang J, Rong J, Ye S. Epidermal growth factor receptor containing exosomes induce tumor-specific regulatory T cells. *Cancer Invest.* 2013 Jun;31(5):330-5. doi: 10.3109/07357907.2013.789905. Epub 2013 Apr 24

- 
- <sup>81</sup> Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 10;106(10):3794-9. doi: 10.1073/pnas.0804543106
- <sup>82</sup> Li W, Hu Y, Jiang T, Han Y, Han G, Chen J, Li X. Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64. *APMIS*. 2014 Nov;122(11):1080-7
- <sup>83</sup> Clark DJ, Fondrie WE, Yang A, Mao L. Triple SILAC quantitative proteomic analysis reveals differential abundance of cell signaling proteins between normal and lung cancer-derived exosomes. *J Proteomics*. 2016 Feb 5;133:161-169. doi: 10.1016/j.jprot.2015.12.023. Epub 2015 Dec 29
- <sup>84</sup> Brinkmann K, Enderle D, Koestler T, Bentink S, Emenegger J, Spiel A, et al., Abstract 545: plasma-based diagnostics for detection of EML4-ALK fusion transcripts in NSCLC patients, *Cancer Res*. 75 (2015) 545
- <sup>85</sup> Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun*. 2011 Feb 1;2:180
- <sup>86</sup> Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):189-98
- <sup>87</sup> Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2009 Jan;10(1):42-6. doi: 10.3816/CLC.2009.n.006
- <sup>88</sup> Giallombardo M, Chacártegui Borrás J, Castiglia M, Van Der Steen N, Mertens I, Pauwels P, Peeters M, Rolfo C. Exosomal miRNA Analysis in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients' Plasma Through qPCR: A Feasible Liquid Biopsy Tool. *J Vis Exp*. 2016 May 27;(111). doi: 10.3791/53900
- <sup>89</sup> Wang S, Li X, Zhu R, Han Q, Zhao RC. Lung cancer exosomes initiate global long non-coding RNA changes in mesenchymal stem cells. *Int J Oncol*. 2016 Feb;48(2):681-9. doi: 10.3892/ijo.2015.3272. Epub 2015 Nov 27
- <sup>90</sup> Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Apr;40:72-81. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.009. Epub 2015 Feb 25. Review
- <sup>91</sup> Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):5991-5; discussion 5995. Review
- <sup>92</sup> Kim J, Kim TY, Lee MS, Mun JY, Ihm C, Kim SA. Exosome cargo reflects TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) status in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 16;478(2):643-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.124. Epub 2016 Aug 1

- 
- <sup>93</sup> Rahman MA, Barger JF, Lovat F, Gao M, Otterson GA, Nana-Sinkam P. Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2016 Aug 23;7(34):54852-54866. doi: 10.18632/oncotarget.10243
- <sup>94</sup> Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2008 May;10(5):619-24. doi: 10.1038/ncb1725. Epub 2008 Apr 20
- <sup>95</sup> Hao S, Ye Z, Li F, Meng Q, Qureshi M, Yang J, Xiang J. Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Exp Oncol*. 2006 Jun;28(2):126-31
- <sup>96</sup> Xiao H, Lässer C, Shelke GV, Wang J, Rådinger M, Lunavat TR, Malmhäll C, Lin LH, Li J, Li L, Lötvall J. Mast cell exosomes promote lung adenocarcinoma cell proliferation - role of KIT-stem cell factor signaling. *Cell Commun Signal*. 2014 Oct 14;12:64. doi: 10.1186/s12964-014-0064-8
- <sup>97</sup> Ribeiro MF, Zhu H, Millard RW, Fan GC. Exosomes Function in Pro- and Anti-Angiogenesis. *Curr Angiogenes*. 2013;2(1):54-59
- <sup>98</sup> Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res*. 2011 Jun 1;71(11):3792-801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4455
- <sup>99</sup> Liu Y, Luo F, Wang B, Li H, Xu Y, Liu X, Shi L, Lu X, Xu W, Lu L, Qin Y, Xiang Q, Liu Q. STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett*. 2016 Jan 1;370(1):125-35. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.011
- <sup>100</sup> Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, Oeh J, Modrusan Z, Bais C, Sampath D, Ferrara N. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J*. 2012 Aug 29;31(17):3513-23. doi: 10.1038/emboj.2012.183
- <sup>101</sup> Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*. 2011 Aug 1;71(15):5346-56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0241
- <sup>102</sup> Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):285-93. doi: 10.1038/nrc2621. Review
- <sup>103</sup> Rana S, Malinowska K, Zöller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia*. 2013 Mar;15(3):281-95
- <sup>104</sup> Jung T, Castellana D, Klingbeil P, Cuesta Hernández I, Vitacolonna M, Orlicky DJ, Roffler SR, Brodt P, Zöller M. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia*. 2009 Oct;11(10):1093-105
- <sup>105</sup> Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King

---

T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):329-35. doi: 10.1038/nature15756

<sup>106</sup> Hegmans JP, Hemmes A, Aerts JG, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Immunotherapy of murine malignant mesothelioma using tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 May 15;171(10):1168-77

<sup>107</sup> S. Hao, O. Bai, F. Li, J. Yuan, S. Laferte, J. Xiang, Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumor immunity, *Immunology* 120 (2007) 90e102

<sup>108</sup> Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, Crawford M, Ozer GH, Wernicke D, Alder H, Caligiuri MA, Nana-Sinkam P, Perrotti D, Croce CM. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 31;109(31):E2110-6. doi: 10.1073/pnas.1209414109

<sup>109</sup> Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013 Feb 18;200(4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138. Review

<sup>110</sup> Wilson C, Nicholes K, Bustos D, Lin E, Song Q, Stephan JP, Kirkpatrick DS, Settleman J. Overcoming EMT-associated resistance to anti-cancer drugs via Src/FAK pathway inhibition. *Oncotarget*. 2014 Sep 15;5(17):7328-41

<sup>111</sup> Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2009 Jan;10(1):42-6. doi: 10.3816/CLC.2009.n.006

<sup>112</sup> Sandfeld-Paulsen B, Aggerholm-Pedersen N, Bæk R, Jakobsen KR, Meldgaard P, Folkersen BH, Rasmussen TR, Varming K, Jørgensen MM, Sorensen BS. Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Mol Oncol*. 2016 Dec;10(10):1595-1602. doi: 10.1016/j.molonc.2016.10.003

<sup>113</sup> Park JO, Choi DY, Choi DS, Kim HJ, Kang JW, Jung JH, Lee JH, Kim J, Freeman MR, Lee KY, Gho YS, Kim KP. Identification and characterization of proteins isolated from microvesicles derived from human lung cancer pleural effusions. *Proteomics*. 2013 Jul;13(14):2125-34. doi: 10.1002/pmic.201200323

<sup>114</sup> Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):189-98

<sup>115</sup> Cazzoli R, Buttitta F, Di Nicola M, Malatesta S, Marchetti A, Rom WN, et al., MicroRNAs derived from circulating exosomes as non-invasive biomarkers for screening and diagnose lung cancer, *J. Thorac. Oncol*. 8 (2013) 1156e1162

- 
- <sup>116</sup> Reclusa P, Giallombardo M, Castiglia M, Sorber L, van Der Steen N, Pauwels P, et al., Exosomal miRNA analysis in non-small cell lung cancer: new liquid Biomarker?: track: biology and pathogenesis, *J. Thorac. Oncol.* 11 (2016) S219eS220
- <sup>117</sup> Lai X, Friedman A. Exosomal miRs in Lung Cancer: A Mathematical Model. *PLoS One*. 2016 Dec 21;11(12):e0167706. doi: 10.1371/journal.pone.0167706
- <sup>118</sup> Siciliano C, Ibrahim M, Scafetta G, Napoletano C, Mangino G, Pierelli L, Frati G, De Falco E. Optimization of the isolation and expansion method of human mediastinal-adipose tissue derived mesenchymal stem cells with virally inactivated GMP-grade platelet lysate. *Cytotechnology*. 2015 Jan;67(1):165-74. doi: 10.1007/s10616-013-9667-y. Epub 2013 Dec 4
- <sup>119</sup> Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973 Nov;51(5):1417-23
- <sup>120</sup> Liu C, Calogero A, Ragona G, Adamson E, Mercola D. EGR-1, the reluctant suppression factor: EGR-1 is known to function in the regulation of growth, differentiation, and also has significant tumor suppressor activity and a mechanism involving the induction of TGF-beta1 is postulated to account for this suppressor activity. *Crit Rev Oncog.* 1996;7(1-2):101-25. Review
- <sup>121</sup> Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014 Nov;70(1):11-20. doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.024
- <sup>122</sup> Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15;66(8):1403-8. Review